



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Wenli CHEN

le mercredi 21 septembre 2016

Titre :

Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules uniques
cancéreuses : de l'optimisation du capteur en sensibilité et
répétabilité jusqu'au suivi en temps réel de stimuli chimiques

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED GEET : Micro et Nanosystèmes

Unité de recherche :

Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (UMR 8001)

Directeur/trice(s) de Thèse :

Katia GRENIER

David DUBUC

Jury :

Matthieu PIEL, Directeur de recherche

Philippe FERRARI, Professeur

Sylvie RENAUD, Professeur

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	6
CHAPITRE I : METHODE D'ETUDE EN BIOLOGIE CELLULAIRE	9
I CELLULE BIOLOGIQUE ET SON MODELE ELECTRIQUE	9
I.1 Propriété biologique de la cellule	9
I.2 Propriété diélectrique de la cellule	10
I.2.1 Cas de la membrane plasmique comme diélectrique	10
I.2.2 Dispersion diélectrique de cellules	11
I.2.3 Circuit électrique équivalent d'une cellule biologique	13
I.2.3.a Modèle de Fricke	13
I.2.3.b Modèle de Debye.....	14
II METHODE D'ETUDE CELLULAIRE CONVENTIONNELLE	15
II.1 Microscopie.....	16
II.1.1 Principe de la microscopie	16
II.1.2 Défis pour les techniques microscopiques	17
II.2 Cytométrie en flux	18
II.2.1 Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux	18
II.2.2 FACS - Le tri des cellules.....	19
II.2.3 Limites.....	20
II.3 Discussions.....	20
III METHODE D'ETUDE CELLULAIRE MICROTECHNIQUE.....	22
III.1 Biocapteur : de nouveaux outils pour la biologie cellulaire	22
III.2 Généralité sur les biocapteurs.....	23
III.2.1 BioMEMS et Biocapteur	23
III.2.2 Définition et principe de fonctionnement du biocapteur	24
III.2.3 La classification des biocapteurs	25
III.3 Détection et caractérisation cellulaire	25
III.3.1 Méthode de détection mécanique	25
III.3.2 Méthode de détection optique.....	27
III.3.2.a Détection par fluorescence.....	27
III.3.2.b Détection par interaction avec les ondes optiques.....	27
III.3.2.c Méthode de détection électronique	28
III.4 Potentialités de la technique de détection de cellule dans la gamme des hyperfréquences.....	31

III.5	Techniques de manipulation cellulaire.....	34
III.5.1	Techniques actives.....	34
III.5.2	Hydrodynamiques	36
III.6	Discussion	38
IV	OBJECTIF DE NOTRE TRAVAIL ET CONCLUSIONS.....	39
CHAPITRE II : OPTIMISATION DU BIOCAPTEUR DEDIE A L'ANALYSE PAR SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE MICRO-ONDE DE CELLULE INDIVIDUELLE 45		
I	DESCRIPTION DU SYSTEME DE SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE.....	45
I.1	Concept du biocapteur micro-onde initial à cellule unique	45
I.2	Matériels et méthodes	47
I.2.1	Méthode de mesure	47
I.2.2	Banc de test.....	49
I.2.3	Extraction des paramètres diélectriques	49
II	AUTOMATISATION DU BANC DE TEST	54
II.1	Interface Homme-Machine	54
II.2	Validation.....	55
III	OPTIMISATION DE LA FABRICATION DES MICROCANAUx FLUIDIQUES ..	57
III.1	Canaux microfluidiques réalisés à partir du matériau PDMS.....	58
III.2	Canaux microfluidiques réalisés à partir de matériaux photosensibles	59
III.2.1	Le polymère SU-8.....	59
III.2.2	Film sec - Dry Film (DF)	63
IV	OPTIMISATION DE L'EFFICACITE DE PIEGEAGE.....	65
IV.1	Description des trois configurations de pièges mécaniques.....	66
IV.2	Étude de l'efficacité de piégeage de particules et de cellules.....	67
V	OPTIMISATIONS PARAMETRIQUES DU BIOCAPTEUR	70
V.1	Impact du diamètre de la particule	71
V.2	Impact de la permittivité relative de la particule	73
V.3	Impact de la largeur du gap capacitif	74
V.4	Impact de l'épaisseur de métallisation.....	78
VII	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	81

CHAPITRE III : EXPERIMENTATIONS STATIQUE ET DYNAMIQUE (EN TEMPS REEL) DE CELLULES UNIQUES	85
I EXPERIMENTATIONS STATIQUES	86
I.1 Étude de répétitivité et répétabilité des mesures	86
I.1.1 Protocole de préparation des solutions de particules/cellules	86
I.1.2 Répétitivité des mesures	88
I.1.2.a Mesures de billes de polystyrène dans le milieu RPMI	88
I.1.2.b Mesures de cellules dans le milieu RPMI	89
I.1.2.c Comparaison des mesures de cellules avec la technologie SU8 et Film Sec	89
I.1.3 Répétabilité des mesures de cellules dans le milieu RPMI	91
I.2 Discrimination de cellules vivante, morte et traitée	92
I.2.1 Cellule morte par appauvrissement du milieu de culture à température ambiante ..	92
I.2.2 Cellule vivante soumise à un traitement thermique	95
I.2.3 Cellule vivante soumise à un traitement chimique	98
Conclusions et perspectives	101
II EXPERIMENTATIONS DYNAMIQUE EN TEMPS REEL	102
II.1 Interface Homme-Machine	102
II.1.1 Fonctions d'acquisition	102
II.1.2 Validation	103
II.1.2.a Mesures en temps réel de l'évaporation d'éthanol	103
II.1.2.b Étude de la répétitivité du suivi en temps réel	105
II.2 Suivi en temps réel de cellules THP1	107
II.2.1 Cellule vivante	107
II.2.2 Cellule vivante soumise à un stimuli chimique	108
II.2.2.a 1 ^{ère} expérience - Suivi avec une résolution temporelle de l'ordre de la minute...	109
II.2.2.b 2 ^{ème} expérience - Suivi avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde	112
III CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	116
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	119

Introduction générale

Au cours des dernières décades, l'analyse de la cellule unique est devenue importante dans les domaines de la biologie et le biomédical, en particulier, en cancérologie. L'hétérogénéité dans une population de cellules cancéreuses fait que les biologistes et scientifiques s'intéressent à la caractérisation profonde et complète des cellules à l'échelle individuelle. L'analyse de la cellule unique aide à comprendre les différences biophysiques, biochimiques et fonctionnelles entre les cellules. Elle aide les médecins à développer un pronostic et concevoir un plan de traitement pour les patients individuellement : la médecine personnalisée.

Après plus d'une décennie de développements, les techniques traditionnelles et l'instrumentation d'étude cellulaire sont matures et très bien établies. A titre d'exemple, la microscopie électrique et la cytométrie en flux fournissent une puissance d'analyse cellulaire incroyable. Ce sont des méthodes conventionnelles essentiellement employées dans les laboratoires de biologie. Malgré leur grande performance, leur méthode de détection basée sur les techniques d'imagerie par fluorescence, de coloration et autres peut être invasive vis-à-vis des cellules. En outre, les manipulations sont complexes et chronophages et ces méthodes nécessitent des instrumentations de mesure très coûteuses.

Dans ce contexte, beaucoup d'investigations ont eu lieu dans les domaines pluridisciplinaires : la chimie, la physique et l'électronique. Grâce aux progrès récents de la microtechnologie, la taille des dispositifs est descendue à l'échelle micrométrique, qui s'adapte à l'analyse de cellules uniques. Et parmi les technique de détection, les méthodes électriques basées sur les interactions entre les ondes électromagnétiques et des systèmes vivants présentent un intérêt attrayant, car ces méthodes sont non-ionisantes et non-destructives. En fonction de la fréquence d'analyse, des informations obtenues relèvent différentes caractérisations de la cellule : sa morphologie (en gamme de basses fréquences de méga hertz), son état vital (interaction avec les ondes optiques) et la modification de sa structure macromoléculaire (en domaine de térahertz). Cependant, les applications dédiées à l'analyse de cellules uniques sont encore peu exploitées dans les hyperfréquences (entre les basses fréquences et térahertz). Pourtant, dans cette gamme de fréquence, les ondes pénètrent à l'intérieur de la cellule, ce qui permet une l'analyse sans colorant ni marquage et sans contact. Les techniques de détection associées étudient les propriétés diélectriques (permittivité et conductivité) de la cellule, ce qu'on appelle la spectroscopie diélectrique hyperfréquence, qui est le cœur de nos recherches.

Nos travaux ont été menés au sein du Laboratoire d'Analyses et d'Architecture des Systèmes (LAAS) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) de Toulouse. Les travaux portent sur l'optimisation d'un biocapteur dédié à la spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules uniques cancéreuses. L'objectif est de montrer la capacité de caractérisation des cellules uniques directement dans leur milieu de culture jusqu'à un suivi en temps réel de stimuli chimiques d'une manière non-invasive.

Ce manuscrit s'organise en trois parties :

- le chapitre I présente le contexte de l'étude. La généralité sur la cellule biologique et ses propriétés diélectriques sont d'abord introduites. Les méthodes conventionnelles utilisées en biologie cellulaire et les nouveaux outils microscopiques pour la détection des cellules uniques sont décrites et comparées,
- le chapitre II traite de l'optimisation du biocapteur micro-onde à cellule unique, qui porte sur sa micro fabrication, l'efficacité de piégeage de son système d'immobilisation des cellules uniques, et la structure géométrique de son circuit de détection métallique hyperfréquence. Ce dernier est réalisé et évalué avec les simulations électromagnétiques, et vérifié avec des mesures de billes de polystyrène,
- le chapitre III se focalise sur la spectroscopie diélectrique des cellules uniques. Deux séries d'expérimentations sont montrées :
 - les mesures statiques des cellules vivantes, mortes et soumises à des stressés d'ordre thermique et chimique,
 - les mesures dynamiques : suivis en temps réel de cellules uniques soumises à des stimuli chimiques.

Chapitre I : Méthode d'étude en biologie cellulaire

Dans ce chapitre, nous commencerons par aborder le contexte de l'étude. Puis nous introduirons quelques généralités sur la cellule biologique et ses propriétés diélectriques. Une présentation des méthodes d'étude cellulaire conventionnelles utilisées en biologie cellulaire sera également effectuée.

Dans la deuxième partie, nous dresserons la liste des nouveaux outils microscopiques permettant l'étude cellulaire. L'évolution des micro et nano technologies, les notions de BioMEMS, « laboratoire sur puce » (Lab-on-a-Chip, LOC) sont d'abord introduites. Les diverses techniques de détection des cellules uniques sont ensuite décrites et comparées.

Dans la dernière partie nous nous focaliserons sur la détection électrique hyperfréquence, qui est l'objectif de notre travail.

I Cellule biologique et son modèle électrique

I.1 Propriété biologique de la cellule

La cellule est l'unité structurelle et fonctionnelle de base de tout être vivant. Les cellules sont de très petite taille et d'organisation très complexe. La connaissance de leur structure, de leur composition chimique et de leur fonctionnement (physiologie) très critique en biologie et science biomédicale [1]. Les études sur la fonctionnalité et le comportement cellulaire ont été largement appliqués dans de nombreuses applications cliniques et biomédicales, tels que le diagnostic de maladies et la connaissance sur leur degré d'évolution, le développement de médicament et la recherche sur le cancer [2].

Les biologistes distinguent deux types fondamentaux de cellules :

- les cellules procaryotes dépourvues de noyau (les bactéries, par exemple),
- les cellules eucaryotes, qui possèdent un noyau (végétal et animal, par exemple),
- et toutes les cellules se présentent sous la forme d'une membrane périphérique, la membrane plasmique, qui sépare les milieux intra cellulaire et environnant.

Les cellules eucaryotes ont une organisation complexe (Figure I.1), d'une taille moyenne entre 10 à 30 μm pour la plupart. Le reste du contenu cellulaire, appelé

cytoplasme, est une matrice riche en eau dans laquelle baigne tous les organites, permettant à la cellule d'assurer ses fonctions. L'un de ses organites, le noyau, se situe au cœur de la cellule et renferme le matériel génétique, dont l'ADN.

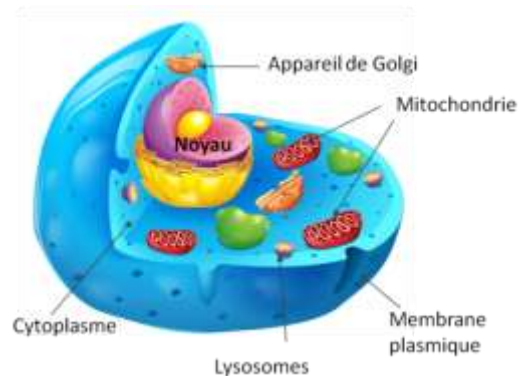


Figure I.1 Structure d'une cellule eucaryote (reproduit de [3])

Nous pouvons également citer d'autres organites principaux dans le cytoplasme comme :

- les mitochondries, qui stockent et fournissent l'énergie indispensable à la cellule. Elles contiennent leur propre ADN,
- l'appareil de Golgi, qui concentre et excrète les protéines élaborées par le réticulum endoplasmique,
- et les lysosomes, qui sont de petites vésicules responsables de la digestion cellulaire.

Connaître les constituants des cellules et leurs fonctionnements est fondamental pour toutes les sciences biologiques. Savoir distinguer les similitudes et les différences entre les types de cellules est particulièrement important dans les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire, et des domaines biomédicaux tels que les recherches en cancérologie.

Les méthodes d'étude cellulaire conventionnelles sont généralement basées sur les techniques d'imagerie par fluorescence en biologie. Ces dernières consistent à observer la structure et la composition cellulaire, permettant ainsi de comprendre le fonctionnement des constituants de la cellule. Ces méthodes conventionnelles sont brièvement présentées dans la section II.

Par ailleurs, la cellule biologique peut être caractérisée suivant différents paramètres : chimiques, mécaniques, électriques... . Nos travaux de recherche étant focalisés sur le développement de la spectroscopie diélectrique micro-onde à l'échelle de la cellule unique, nous rappelons ci-après quelques connaissances importantes vis à vis des propriétés diélectriques d'une cellule.

I.2 Propriété diélectrique de la cellule

I.2.1 Cas de la membrane plasmique comme diélectrique

Les cellules vivantes sont, comme nous l'avons présenté précédemment, cloisonnées par une membrane plasmique, qui joue un rôle important dans le cadre de notre étude. Selon le modèle de Singer et Nicholson [4], la membrane se compose de deux couches lipidiques (phospholipides) et intègre également des protéines. La bicouche lipidique fournit une structure fluide de la membrane et forme une barrière semi - imperméable à la plupart des molécules solubles dans l'eau. L'une des protéines présentes (les protéines transmembranaires) traverse la bicouche lipidique créant ainsi des canaux très étroits pour faire passer les substances à travers la membrane plasmique, tels que des ions ou de l'eau. Les ions sont des particules chargées électriquement qui existent en abondance dans les milieux extracellulaire et intracellulaire. D'un point de vue électrique, le déplacement des ions dans les canaux de protéines génère un courant, passant à travers la membrane isolante d'une manière passive. Ce fait relève que la membrane se comporte comme un diélectrique.

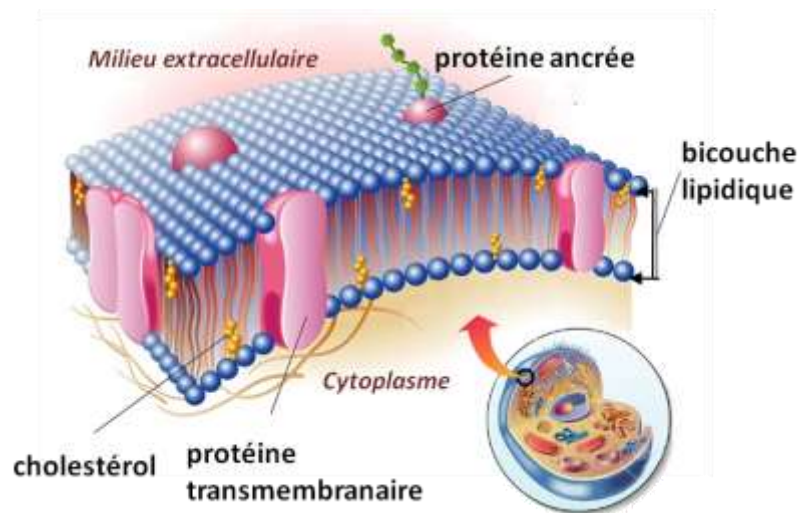


Figure I. 2 Structure de la membrane plasmique (reproduit de [5])

I.2.2 Dispersion diélectrique de cellules

La réponse d'une cellule en présence d'un champ électrique dépend de deux paramètres qui sont la **permittivité diélectrique relative** (notée ϵ_r) qui reflète la capacité à polariser un matériau par accumulation de charges et la conductivité électrique (notée σ) qui reflète la capacité à laisser passer un courant électrique avec un minimum de pertes.

Les concepts fondamentaux de phénomènes diélectriques dans les milieux biologiques et leur interprétation d'interactions au niveau cellulaire sont bien établis, en se basant sur les travaux du Pr. Schwan [6], [7] et Foster [8]. Les propriétés diélectriques des cellules dépendent de la fréquence et présentent des phénomènes de relaxation et de résonance (cf. Figure I.3), fonction de polarisations différentes. Les relaxations sont nommées α , β et γ et sont plus souvent désignées par le terme de **dispersion** car l'absorption diélectrique résultante est observable sur une large plage

de fréquences [6]–[8]. Les principaux phénomènes de relaxations observés à partir d'un tissu biologique sont les suivants:

- la dispersion α : Elle intervient dans la gamme des basses fréquences jusqu'à quelques kilohertz. Sous l'effet d'un champ électrique, la dispersion est associée à des processus de diffusion ionique intervenant à la surface de la membrane cellulaire et entraînant l'apparition d'un dipôle à l'échelle de la cellule. Les membranes ont un comportement capacitif qui interdit le passage du courant dans le milieu intracellulaire.
- la dispersion β : Elle intervient dans la gamme des fréquences 500 KHz - 20 MHz. Cette dispersion est principalement due à la polarisation de la membrane plasmique. A ces fréquences, la membrane n'est plus isolante: elle autorise la circulation d'un courant dans le milieu intracellulaire. La conductivité électrique devient représentative de la conductivité d'intracellulaire global en plus du milieu extracellulaire. La relaxation dipolaire est bien modélisée par la théorie des mélanges de Maxwell-Wagner [9], [10].
- la dispersion γ : Elle intervient dans la gamme des fréquences micro-ondes. Cette dispersion est provoquée par la teneur élevée en eau dans les cellules. L'orientation dipolaire des molécules d'eau libre se relaxe à 20 GHz. A ces fréquences, la membrane plasmique est électriquement transparente et donne accès au milieu intracellulaire. Les protéines, acides aminés et autres constituants cellulaires affichent quant à eux un large spectre de dispersion à partir de quelques centaines de MHz à quelques GHz.
- Puis les deux zones supplémentaires à plus hautes fréquence sont dues à des phénomènes de résonance atomique et électronique.

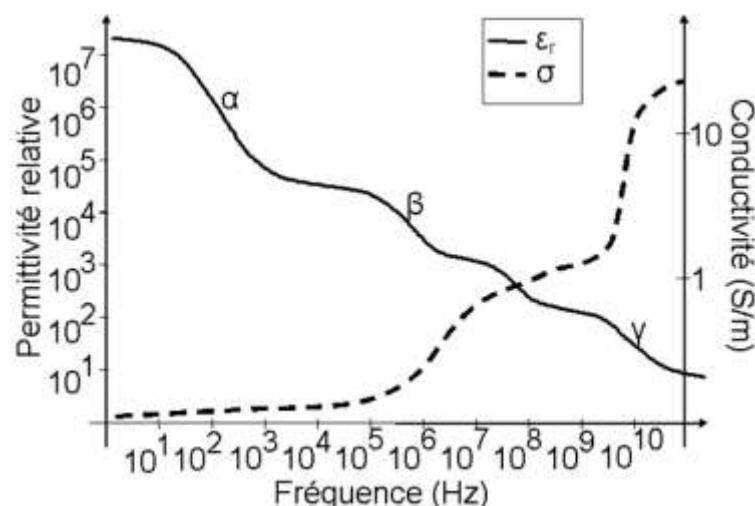


Figure I.3 Principaux phénomènes de relaxations observés dans les tissus biologiques (reproduit de [11])

La conductivité électrique et la permittivité diélectrique de quelques tissus biologiques sont présentées à la Figure I.4, à partir des travaux de Gabriel *et al.* [12] faisant référence en la matière.

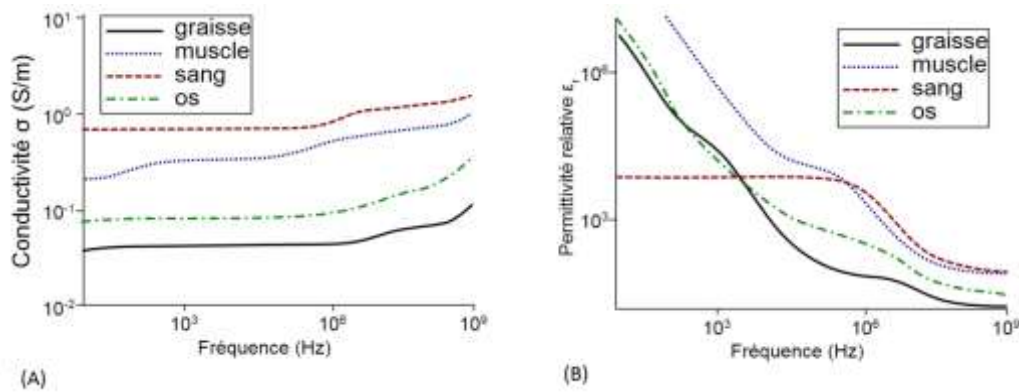


Figure I.4 Conductivité et permittivité de quelques tissus biologiques (reproduit de [12])

Dans le cas de la relaxation diélectrique qui nous intéresse, lorsqu'on applique brusquement un champ électrique à la cellule, sa polarisation s'établit après un certain temps dit temps de relaxation τ . Le phénomène de relaxation s'accompagne donc d'une déperdition d'énergie.

Pour tenir compte du phénomène de perte d'énergie, est introduite la notion de permittivité relative complexe décrite par Équation I.1:

$$\epsilon_r^*(f) = \epsilon_r'(f) - j\epsilon_r''(f) \quad \text{Équation I.1}$$

Avec $\epsilon_r'(f)$ la partie réelle de la permittivité relative et la partie imaginaire $\epsilon_r''(f)$ de la permittivité relative complexe qui traduit les dissipations (diélectriques) d'énergie du matériau.

I.2.3 Circuit électrique équivalent d'une cellule biologique

Différents modèles empiriques peuvent être utilisés pour approximer les variations fréquentielles des propriétés électriques des cellules. La modélisation électrique des cellules fut premièrement proposée par R. Höber dans les années 1910, qui a étudié l'évolution de la résistivité d'un échantillon de sang aux basses et hautes fréquences [12]. A la suite de ces premières observations, plusieurs modèles électriques de la cellule ont été construits dans le milieu du XX^e siècle, tels que le modèle de Fricke [14], Debye [15], et Cole-Cole [16]. Ces modèles sont encore largement utilisés de nos jours dans les études du comportement électrique des milieux biologiques.

I.2.3.a Modèle de Fricke

En 1^{ère} approche, la cellule en suspension peut être assimilée à un circuit électrique composé d'une capacité C_m représentant la membrane (modélisation du phénomène de polarisation apparaissant à l'interface) associée en série avec une résistance R_i représentant le milieu intracellulaire ou plutôt les charges libres internes à la cellule. Le milieu extracellulaire est modélisé par une résistance R_e .

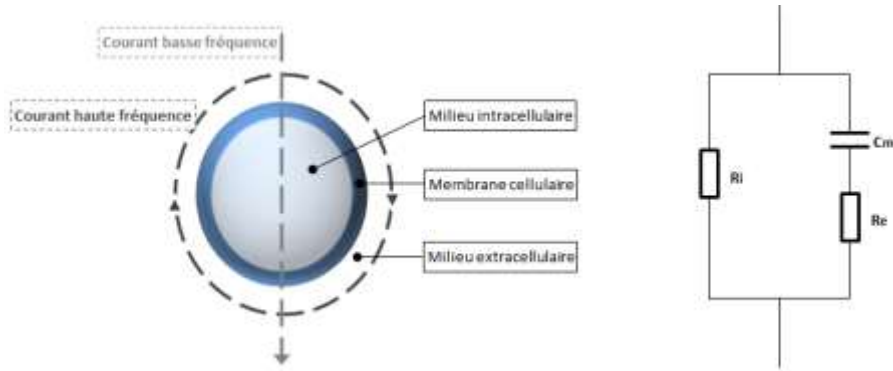


Figure 1.5 Modèle cellulaire de Fricke (à gauche) et schéma électrique (à droite)

Aux basses fréquences (inférieures à 100 MHz), les propriétés électriques de la membrane prédominent : la membrane possède une faible conductance agissant comme un isolant. Le courant n'est pas en mesure de pénétrer dans la cellule. La plupart des flux de courant contournent la cellule. L'effet isolant de la membrane cellulaire diminue lorsque la fréquence augmente.

Aux plus hautes fréquences, le milieu intracellulaire prend le relais en tant que conducteur.

I.2.3.b Modèle de Debye

Selon le modèle de Debye [15] constituant la base des modèles utilisés actuellement, la variation de permittivité relative du matériau entre une valeur maximale ϵ_{rs} mesurée en statique et une valeur minimale $\epsilon_{r\infty}$ idéalement observée à une fréquence infinie est décrite par Équation I.2 suivante :

$$\epsilon_r^*(f) = \epsilon_{r\infty} + \frac{\epsilon_{rs} - \epsilon_{r\infty}}{1 + j \frac{f}{f_R}} \quad \text{Équation I.2}$$

Où $f_R = \frac{1}{2\pi\tau}$ caractérise la constante de fréquence du phénomène de relaxation considéré. Cette équation peut être séparée en ses parties réelles et imaginaires pouvant être tracées en fonction de la fréquence, comme montré à la Figure I.6.

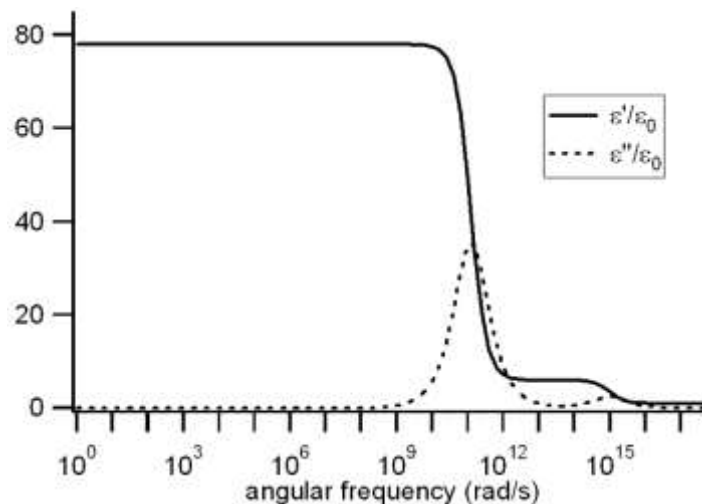


Figure I.6 La relaxation de Debye de l'eau à 30°C (reproduit de [17])

Nous constatons que ϵ'_r est constant au-dessus et au-dessous de la relaxation avec une transition se produisant à proximité de la fréquence de relaxation. En outre, ϵ''_r est faible au-dessus et au-dessous la relaxation avec un maximum qui apparaît dans la zone de transition à la fréquence de relaxation.

Notons que l'orientation dipolaire des molécules d'eau libre se relaxe autour de 20 GHz. Les cellules sont composées essentiellement d'eau, elles peuvent donc également être caractérisées dans cette gamme de fréquence. De plus, la membrane plasmique est électriquement transparente dans cette gamme de fréquence, ce qui permet de sonder le contenu intracellulaire.

L'intérêt de cette approche basée sur les propriétés diélectriques des cellules permet de comprendre divers phénomènes biologiques. Cependant, la majorité des études réalisées sont basées sur l'effet diélectrique de la membrane cellulaire aux basses fréquences. Mais lorsque les fréquences s'accroissent (dans les hyperfréquences), la membrane devient transparente électriquement. La pénétration des ondes à l'intérieur de la cellule permet donc d'effectuer les caractérisations diélectriques du milieu intracellulaire. L'absence de modélisation et d'outils de caractérisation dans cette gamme de fréquence, est la principale source de motivation à l'origine de nos recherches.

Dans la section III, les nouvelles méthodes d'études cellulaires basées sur la microtechnologie suivant différents paramètres (mécaniques, optiques et électriques) seront présentées tout en mettant en lumière les méthodes de caractérisation électrique dans les hyperfréquences.

II Méthode d'étude cellulaire conventionnelle

En raison de la très petite taille et la complexité des cellules, la biologie cellulaire et moléculaire est de plus en plus dépendante des développements de nouveaux instruments ainsi que des technologies associées. En conséquence, il est impératif pour tout biologiste cellulaire de connaître et maîtriser les technologies nécessaires à la collecte de données biologiques [18]. Après plus de 150 ans de développements, les techniques traditionnelles et l'instrumentation d'étude cellulaire sont matures et très bien établies dans les laboratoires de biologie. Parmi eux, la microscopie et la cytométrie en flux sont les deux techniques les plus couramment utilisées dans le domaine de la biologie cellulaire.

L'observation des structures biologiques est difficile parce que les cellules sont généralement trop petites et transparentes à la lumière visible. La mise au point de

nouveaux instruments est l'objet d'un effort constant dans le but d'arriver à une meilleure définition des structures cellulaires.

II.1 Microscopie

II.1.1 Principe de la microscopie

La microscopie correspond à l'exploitation de techniques d'imagerie optiques pour l'observation d'échantillons (cellules) fixés ou non à travers un microscope. L'image obtenue nous permet d'analyser la morphologie de la cellule, ou encore d'étudier leurs organites intracellulaires par coloration via des composants biochimiques.

Le développement et le raffinement de la microscopie permettent d'approfondir les connaissances concernant la structure cellulaire, non seulement dans la cellule tuée par fixation mais aussi dans la cellule à l'état vivant. Un certain nombre de microscopes ont été mis au point pour permettre l'observation des cellules. Parmi ces microscopes, nous distinguons principalement deux familles :

- les microscopes optiques, y compris : Microscope à contraste de phase, Microscopie en fluorescence, Microscope Confocal et Microscope à lumière polarisée, etc.,
- les microscopes électriques, y compris : Microscope à transmission et Microscope à balayage, etc.

Une comparaison entre les deux familles de microscopes est donnée au Tableau I. 1, en résumé [18] :

- en microscopie optique, les cellules vivantes peuvent être étudiées directement. Mais seulement quelques constituants cellulaires sont visible tels que le noyau, les mitochondries et les chromosomes,
- en microscopie électrique, la structure cellulaire complète peut être étudiée. Mais les cellules sont mortes, elles doivent être traitées par les méthodes dite fixation pour être analysées.

Tableau I. 1 Comparaison des deux microscopies

	Microscopie Optique	Microscopie Electronique
Caractéristiques	Zoom : 25 à 2000 fois	Zoom : 1500 à 2 millions fois
	Résolution : env. 0.2 μm	Résolution : 10 \AA
	Observation par photons	Observation par électron
	Coupe biologique : au microtome de 2 à 10 μm	Coupe biologique : à l'ultramicrotome : 0,05 μm
Avantages	Voir la cellule en entière	Voir l'ultrastructure des organites
	Pouvoir observer une cellule vivante	Pouvoir observer au niveau moléculaire
Limites	Observations limitées par son pouvoir de grossissement	La cellule est morte Pas de vue d'ensemble de la cellule

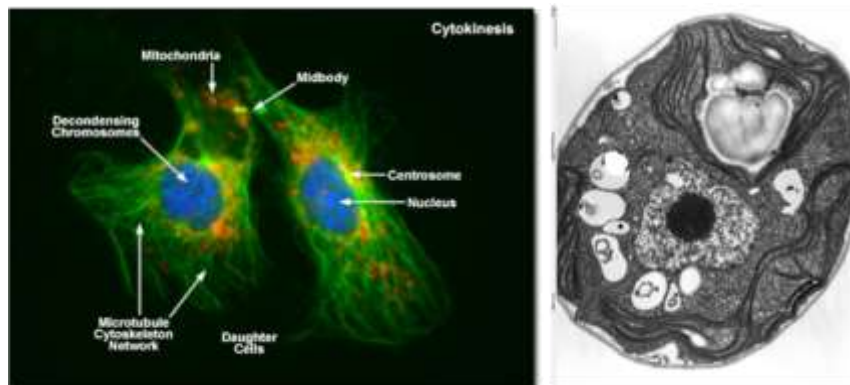


Figure I. 7 Images des deux cellules Cytokinesis prises par microscope optique à fluorescence (gauche) et une coupe ultra fine de la *Chlamydomonas* prise par microscope électrique à balayage (reproduit de [19] et [20])

II.1.2 Défis pour les techniques microscopiques

Les microscopes et leur système d'enregistrement continuent d'évoluer [21]. Les améliorations s'articulent autour d'une meilleure spécificité (par exemple pour visualiser seulement les protéines d'intérêt), d'un perfectionnement de la résolution, et du suivi des cellules dans les conditions les plus proches de celles de l'organisme d'origine.

II.2 Cytométrie en flux

Les microscopes ont toujours un rôle très important pour l'étude de cellules, cependant, des essais à l'échelle de cellule unique sont difficiles à réaliser. Cependant, depuis le milieu du XX^e siècle, les scientifiques et les ingénieurs ont commencé à accorder un grand intérêt pour les techniques de manipulation des particules biologiques individuelles, non seulement dans l'observation de cellules fixées. En 1934, le premier appareil permettant de réaliser des numérations cellulaires¹ est conçu par Andrew Moldovan [22]. L'appareil fait défiler les cellules dans un tube capillaire où les cellules étaient vues par un capteur photo-électrique. Ce travail mérite d'être reconnu pour la première description de la cytométrie en flux.

La cytométrie en flux décrit une technique de caractérisation quantitative et qualitative de particules (cellules, bactéries, parasites, billes...) en suspension, à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. La caractérisation individuelle est basée sur l'étude de la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) des particules à analyser.

Cette technique a été en développement durant de nombreuses années. Elle couvre un large champ d'application dans des disciplines très variées telles que la biologie médicale, la pharmacologie, l'hématologie, l'immunologie, la microbiologie et l'océanologie, etc. Cette technique particulièrement intéressante en biologie cellulaire est, pour l'instant, le seul moyen pour effectuer des analyses quantitatives d'expression sur chaque cellule individuelle en suspension : l'état d'activation, de maturation, de prolifération, ou de mort.

II.2.1 Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

La représentation schématique d'un cytomètre en flux est montrée à la Figure I. 8. L'instrument est généralement composé du :

- système fluide : qui permet d'introduire et positionner les cellules à analyser,
- système optique : qui permet de produire et recueillir des signaux lumineux,
- système électronique et informatique : qui permet de convertir des signaux optiques en signaux électroniques et numérisation pour analyse informatique.

¹La numération cellulaire est la détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de cellules par litre.

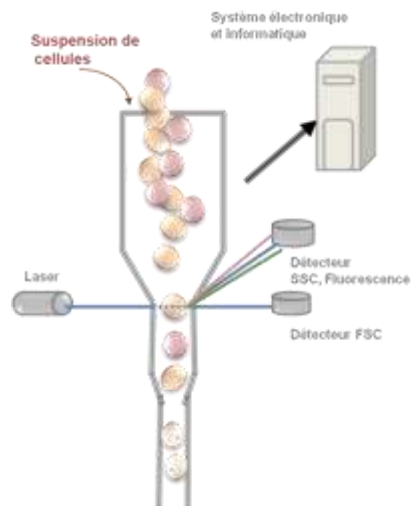


Figure I. 8 Représentation schématique d'un cytomètre de flux

Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec des propriétés cellulaires [23]:

- la lumière diffractée Forward SCatter - FSC) évalue la taille et la surface de la cellule,
- la lumière réfléchiée et réfractée, (Side SCatter - SSC) évolue la granularité et de la complexité cellulaire,

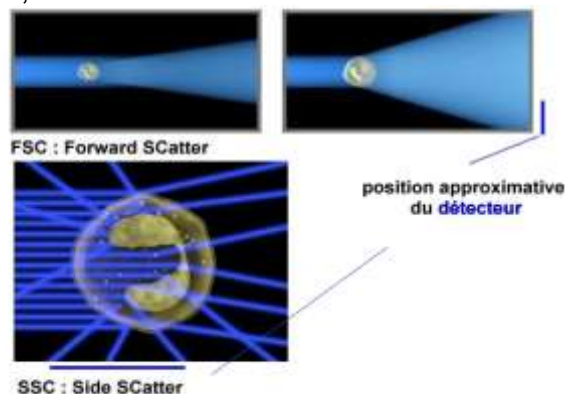


Figure I. 9 Les signaux optiques FSC et SSC (reproduit de [23]).

Les paramètres FSC et SSC permettent un premier tri des catégories cellulaires, mais ils ne suffisent pas pour une reconnaissance précise.

- les signaux de fluorescence : ils sont émis par un anticorps couplé à un fluorochrome, qui se lie spécifiquement à la cellule, ils donnent une mesure de l'intensité de marquage.

II.2.2 FACS - Le tri des cellules

Fluorescence - activated cell sorting (FACS) est un type spécial de la cytométrie en flux. Le FACS fournit une méthode de séparation physique d'une suspension hétérogène de cellules biologiques dans deux ou plusieurs récipients, une cellule à la

fois. Le procédé de tri est basé sur la diffusion de lumière spécifique et des caractéristiques de fluorescence de chaque cellule. Le principe consiste à marquer spécifiquement les cellules à sélectionner dans la population grâce à un colorant fluorescent. Par exemple, cela peut être un anticorps dirigé contre une protéine cellulaire de surface et lié à une substance fluorescente qui ira se fixer aux cellules portant cette protéine à leur surface. Parmi des milliers de cellule, le FACS est donc capable de sélectionner la cellule portant un marqueur déterminé.

II.2.3 Limites

En réalisant une analyse quantitative multiparamétrique, à l'échelle de la cellule individuelle ou de sous-populations au sein d'échantillons hétérogènes, la cytométrie en flux est ainsi devenue une méthode de référence dans la recherche sur le cancer [24]. La cytométrie en flux permet de réaliser des études dose-réponse rapidement et très précisément en analysant plusieurs marqueurs de façon simultanée. Il est ainsi possible en une seule expérience de tester l'efficacité d'un composé sur la viabilité, les mécanismes de mort cellulaire, le potentiel mitochondrial, les dommages à l'ADN ou encore la prolifération, et de croiser ces paramètres avec la détection de marqueurs moléculaires membranaires, véritables signatures de sous-types cellulaires, ou de molécules intracellulaires (voies de signalisation impliquées, effecteurs...) [24]–[26].

Cependant, cette technique a ses points faibles :

- l'étape de prétraitement de l'échantillon, qui allonge le temps d'analyse et les manipulations,
- la nécessité d'un nombre de cellules assez important, de quelques centaines de milliers au minimum, qui est contraignante pour l'étude des cellules primaires,
- les équipements sont chers (à l'ordre de 10 k€ à 100 K€), complexes et qui demandent des coûts de fonctionnement (entretien, marqueurs fluorescents).

II.3 Discussions

Dans ce chapitre, nous avons montré les deux méthodes traditionnelles d'analyse cellulaire en biologie. Ces méthodes matures et évoluées depuis plusieurs décennies, permettent d'étudier la morphologie de la cellule, leur caractérisation biologique, la composition et le contenu cellulaire. Elles sont largement utilisées dans les laboratoires et cliniques pour étudier et analyser des cellules telles que les cellules cancéreuses et des cellules de différentes pathologies grâce au traitement d'image (la microscopie) et grâce à la capture et à l'analyse des données (cytométrie en flux).

Cependant, face à leur puissance d'analyse exceptionnelle, les méthodes traditionnelles ont un inconvénient majeur induit par la préparation préliminaire des

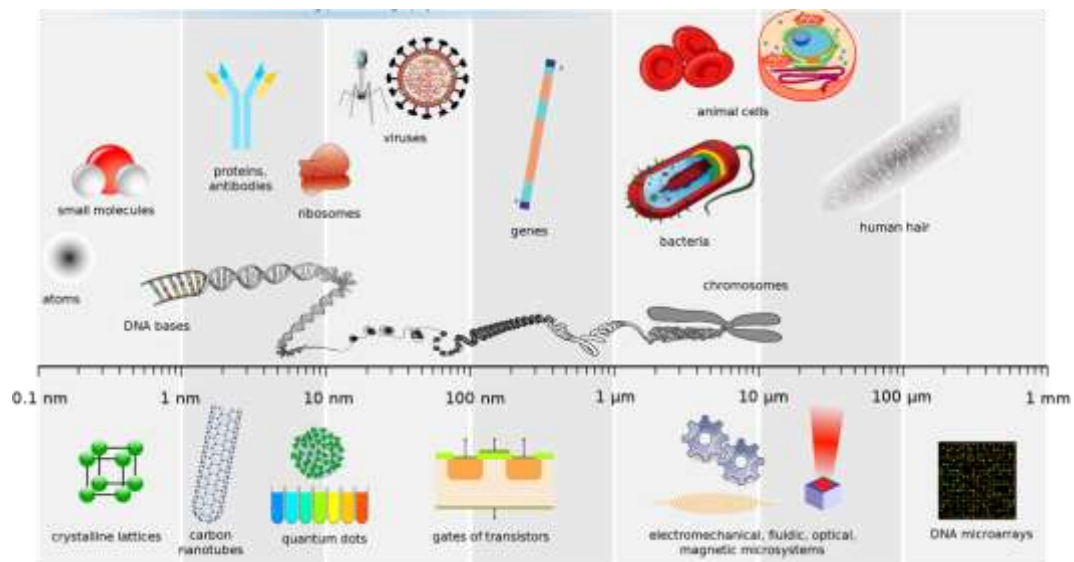
cellules, l'étape de marquage des cellules, soit par coloration en cas de microscopie, soit par marqueur fluorescent. Ce marquage peut modifier l'intégrité physiologique de la cellule et poser des problèmes lorsque celle-ci doit être transplantée dans un nouvel organisme par la suite. De plus, il s'agit de manipulations complexes, longues et coûteuses.

Les nouveaux développements reposent donc sur des techniques d'analyse des paramètres cellulaires qui sont à la fois rapides et non-invasives, qui permettent de conserver la cellule dans des conditions d'intégrité maximales.

III Méthode d'étude cellulaire microtechnique

La convergence entre objets technologiques et naturels à l'échelle du micro et du nanomètre est soulignée depuis longtemps, comme indiqué sur la Figure I. 10, y compris par Stanley Field [27] dont la déclaration est devenue célèbre :

« *Because technology provides the tools and biology the problems, the two should enjoy a happy marriage* ».



III.1 Biocapteur : de nouveaux outils pour la biologie cellulaire

La biologie moderne et en particulier l'analyse génétique recourt de plus en plus à des moyens d'analyse sophistiqués. On cherche à obtenir de plus en plus d'informations ce qui nécessite de plus en plus de réactifs souvent coûteux et donc on cherche à réduire la taille des échantillons pour réduire les coûts. Parallèlement, le milieu de réaction lui-même doit souvent être le plus proche possible du milieu réel que l'on étudie (souvent la cellule).

La miniaturisation des dispositifs d'analyse est un des objectifs à l'heure actuelle du domaine de la biologie. Un enjeu majeur consiste à développer des biocapteurs qui permettent de travailler à l'échelle de la cellule unique.

Plusieurs études récentes montrent l'hétérogénéité cellulaire ou distributions multimodales dans une population de cellules [29], [30]. Les cellules uniques d'un même type présentent une variété de comportements. Cette variation d'expression est due en partie à la nature discrète des événements moléculaires et cellulaires. Elle implique de nombreuses conséquences sur les mécanismes de différenciation cellulaire et entraîne des hétérogénéités dans une population de cellules.

Or, jusqu'à maintenant, de nombreuses études cellulaires s'appuient sur la réponse moyenne des cellules en population. Et ces résultats moyennés sont utilisés pour prédire les paramètres biophysiques et biochimiques de la cellule. Toutefois, cette méthode peut conduire à une interprétation erronée et laisser passer l'information essentielle dans la cellule. Il y a donc un enjeu important à étudier la réponse cellulaire à l'échelle individuelle dans les domaines de recherche de biologie cellulaire et biomédicale [31], [32].

La réalisation de petits dispositifs adaptant à l'étude de la cellule unique, est devenue possible grâce au développement des nano-micro technologies.

III.2 Généralité sur les biocapteurs

III.2.1 BioMEMS et Biocapteur

Le **BioMEMS** désigne, comme son nom l'indique, un microsystème électromécanique, ou **MEMS** (Micro Electro Mechanical System), et par extension tout système obtenu par les techniques de fabrication des micro-nanotechnologies et de micro-usinages. Il est utilisé pour des applications biologiques et médicales telles que le diagnostic, la thérapeutique, l'administration de médicaments ou la surveillance en temps réel [33]–[35].

Issus des techniques de la micro-électronique, le MEMS a été conçu pour fabriquer des structures complexes à l'échelle micrométrique. Les MEMS sont généralement composés de microréservoirs, microvannes, micropompes, micromélangeurs et microréacteurs [36]. Depuis sa naissance dans les années 1970, la technologie MEMS a suscité un intérêt considérable dans des domaines variés, accompagné d'un succès commercial. Par exemple, presque tous les Smartphones sont munis d'accéléromètres et gyromètres MEMS, qui détermine l'orientation de l'écran.

L'intégration de la gestion des flux de volumes microscopiques, la microfluidique, aux composants et des dispositifs de base du MEMS, aboutit à divers nouveaux capteurs et plates-formes de détection aux applications biologiques et chimiques : les BioMEMS [37]. Ils sont souvent considérés comme synonyme de « laboratoires sur puces » (Lab-on-a-Chip, LOC)² et microTAS (micro Total Analysis Systems, microsystemes d'analyse totale)³. Ainsi, en permettant la mise en commun d'un

² LOC : désigne d'un système miniaturisé qui permet d'intégrer dans un composant de petite dimension (quelques centimètres) d'une ou de plusieurs opérations classiquement réalisées dans les laboratoires de chimie ou de biologie[38]

³ microTAS : désigne l'intégralité de la séquence d'analyse (de introduction de l'échantillon brut jusqu'à la lecture du résultat) est réalisée à l'intérieur d'un seul microsystème[39].

nombre important de données, les BioMEMS représentent une avancée technique fondamentale pour la recherche biomédicale. Leur utilité est en effet scientifiquement incontestable car il devient alors possible, outre l'étude de cellules très ciblées, d'étudier de manière indépendante, des mécanismes biologiques particuliers indispensables aujourd'hui à la compréhension de nombreux phénomènes biologiques. On peut citer comme exemple le développement des cancers, l'apoptose cellulaire, ou encore l'identification de nouveaux traitements et la mise au point de nouveaux outils de diagnostic [35], [40].

En outre, les BioMEMS apportent de nombreux avantages par rapport aux méthodes classiques (section II) :

- la diminution des volumes des réactifs et des échantillons biologiques, du microlitre jusqu'au pico litre. Cela limite l'utilisation de réactifs peu disponibles ou coûteux, avec donc une réduction du coût des expériences,
- la réduction des coûts de fabrication avec une production en masse,
- l'augmentation de vitesse du diagnostic, les dispositifs miniatures autorisent la réalisation d'un grand nombre de tests en parallèle, accélérant la production de résultats.

Les champs de recherches et d'applications des BioMEMS sont donc très vastes [41]. Parmi eux, notre travail se focalise sur les applications de diagnostic et pronostic à long terme, au travers du développement de micro biocapteurs pour l'analyse cellulaire.

III.2.2 Définition et principe de fonctionnement du biocapteur

Le biocapteur est un outil analytique composé d'un élément biologiquement sensible appelé biorécepteur lié à un transducteur. L'objectif du développement d'un biocapteur est d'aboutir à un dispositif de taille réduite (portatif) permettant de détecter, d'alerter, voire de doser directement l'analyte d'intérêt, de façon rapide, de préférence sans nécessiter l'ajout d'autres réactifs ou de prétraitement de l'échantillon[42].

La construction d'un biocapteur est illustrée à la Figure I. 11. Il est composé de deux éléments principaux :

- le biorécepteur, qui assure la reconnaissance de l'élément biologique,
- le transducteur, qui assure la conversion du signal biologique en un signal mesurable.

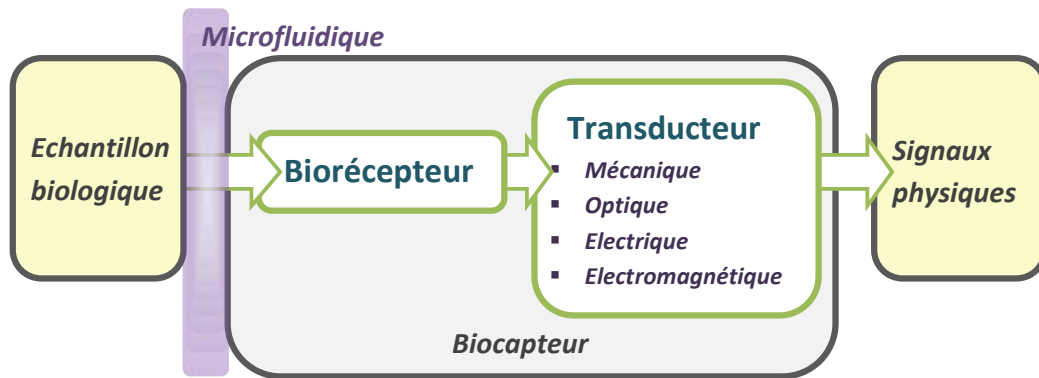


Figure I. 11 Représentation systémique d'un biocapteur

III.2.3 La classification des biocapteurs

Les biocapteurs peuvent être classés par type de biorécepteur, mais généralement ils sont classés selon la nature de leurs transducteurs. Certains types de transducteurs sont couramment utilisés pour la conception de biocapteurs, tels que : mécanique, optique et électrique.

Dans le paragraphe suivant, nous présenterons quelques exemples d'applications pour chaque type de biocapteurs dans le domaine de la biologie cellulaire notamment.

III.3 Détection et caractérisation cellulaire

III.3.1 Méthode de détection mécanique

La détection d'entités biologiques ou de réactions biochimiques avec l'interface de biocapteur est étudiée par la transduction d'un signal biologique ou la présence d'un élément biologique en un signal mécanique, par l'utilisation de micropoutres micromécanique (nano-micro cantilevers en anglais) [43]. La poutre a deux modes de détection qui sont montrés sur la Figure I. 12:

- en mode statique, la surface de la poutre se plie, et la déflection dépend de la contrainte induite par la réaction de liaison de l'analyte à l'interface,
- en mode de détection dynamique, le changement de la fréquence de résonance de la poutre est induit par la masse d'analyte. L'augmentation de la masse sur la surface entraîne la diminution de la fréquence de résonance.

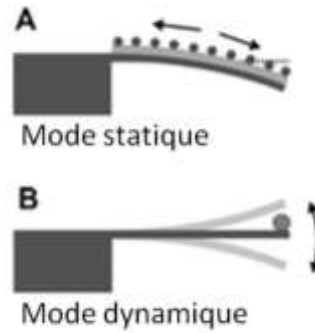


Figure I. 12 Deux modes de détection du cantilever (reproduit de [43]).

L'exemple [44] montré à la Figure I. 13 vise à mesurer les forces de traction d'une cellule sur un substrat muni des micropiliers. La déformation de ces micropiliers donne une information sur la traction induite par la cellule au cours de son développement.

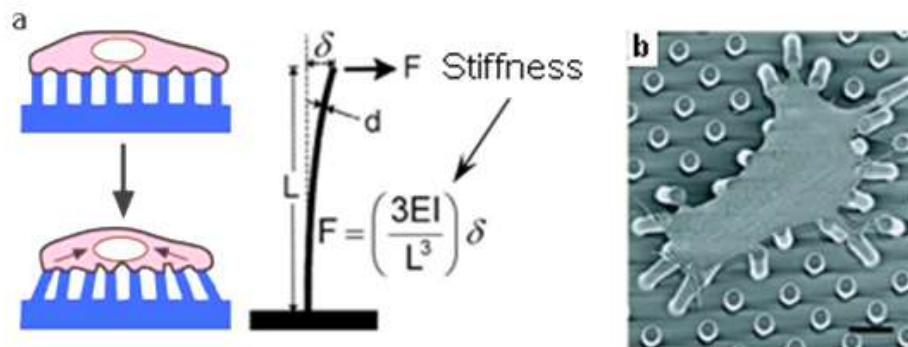


Figure I. 13 Transduction mécanique d'une cellule sur un substrat muni des micropiliers (reproduit de [44])

Les méthodes de détection mécanique sont généralement sans utilisation de marqueur spécifique. Mais ils exigent une réalisation et une bio-fonctionnalisation de surface des cantilevers très délicates.

III.3.2 Méthode de détection optique

III.3.2.a Détection par fluorescence

La majorité des biocapteurs optiques sont basés sur la détection de fluorescence. Ces techniques utilisent des techniques de marquage des éléments biologiques par des molécules fluorescentes pour obtenir une sensibilité et spécificité de détection suffisante. Par exemple, le biocapteur indiqué dans la référence[45] présente une détection sur puce de bactéries *E.Coli* en utilisant des anticorps marqués par fluorescence. L'inconvénient majeur de ces techniques est l'utilisation du marqueur spécifique qui rend la manipulation plus longue (préparations des échantillons), plus complexe et plus coûteuse.

En outre, quelques travaux récents démontrent la possibilité de détection sans marqueur, telles que l'exploitation de la bio-chimioluminescence (technique optique sans marquage)[46] et la découverte de la protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein - **GFP**, Figure I. 14). Cette dernière est un marqueur naturel, qui permet de visualiser l'expression des gènes dans les cellules [47].

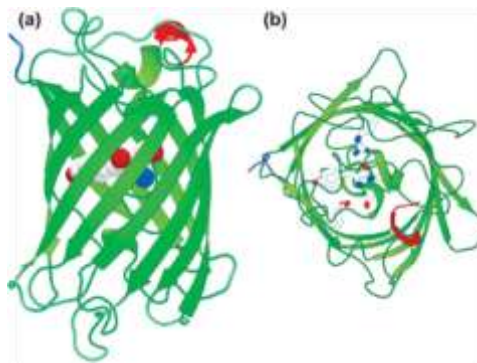


Figure I. 14 Structure de la GFP d'une méduse (*Aequorea victoria*) (reproduit de [48])

III.3.2.b Détection par interaction avec les ondes optiques

Cette approche consiste à utiliser les ondes du domaine optique pour sonder les éléments biologiques. Par exemple, il est possible de détecter une cellule unique par son indice de réfraction optique (RI) [49]–[51]. Une cellule vivante est composée des organites et les molécules biologiques (protéines, lipides, etc.) d'indices de réfractifs optiques différents. Par exemple, l'indice de réfraction de l'eau est égal à 1,33, et celle des membranes sont à l'ordre de 1,46. La composition change entre les cellules vivantes, mortes et cancéreuses. Par conséquent, la détection, ainsi que la différenciation des cellules peuvent être effectuées [51] (Figure I. 15).

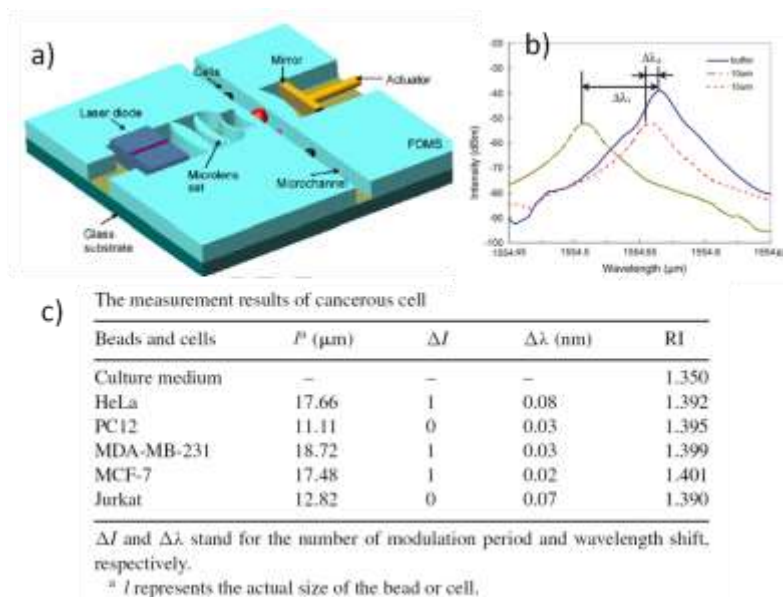


Figure I. 15 Système de caractérisation de cellules uniques cancéreuses par la mesure de RI (reproduit de [51])

Cette méthode basée sur la mesure de l'indice de réfraction est intéressante : elle fournit la détection et la distinction de cellules vivantes uniques avec une bonne précision, et sans nécessité d'utilisation du marqueur spécifique par rapport aux méthodes d'optique classique. L'affranchissement de l'utilisation de marqueurs spécifiques passe par l'utilisation de méthodes de détection sensibles aux phénomènes d'interaction ondes/matières biologiques et ouvre des perspectives de développement des outils pour la spectroscopie cellulaire.

III.3.2.c Méthode de détection électronique

Les techniques de détection électrique sont basées sur la transduction des signaux biologiques en signaux électriques. Les principaux avantages de ces techniques incluent la facilité de mise en œuvre, la faible consommation et la grande flexibilité de la dimension des capteurs et des paramètres de sensibilité. Elle est favorable à la portabilité et la miniaturisation du système, en comparaison aux autres méthodes de transduction.

Il existe plusieurs techniques : ampérométrie, potentiométrie, conductimétries et impédancemétrie [35] :

- les biocapteurs ampérométriques impliquent un courant électrique associé à un déplacement d'électrons,
- les biocapteurs potentiométriques mesurent un changement de potentiel entre deux électrodes dus aux ions ou aux réactions chimiques sur une électrode (telle qu'un FET sensible aux ions),
- les biocapteurs conductimétriques mesurent des changements de conductivité liés aux changements du milieu ionique global entre les deux électrodes,

- les biocapteurs électromagnétiques mesurent des changements d'impédance

Beaucoup de moyens de transduction utilisent des méthodes de mesure basées sur l'interaction d'un champ électromagnétique avec la matière biologique. Ces techniques sont non invasives et s'appuient sur la variation d'un comportement diélectrique cellulaire en fonction de la fréquence.

III.3.2.c.1 Bio-impédancemétrie

Le principe de la détection repose sur la variation d'impédance causée par la présence des échantillons biologiques placés entre des électrodes métalliques, techniques dites de bio-impédance. Cette technique consiste à faire passer un faible courant alternatif (AC) à travers un échantillon biologique et à déterminer sa réponse en impédance en fonction de la fréquence. Les données d'impédancemétrie reflètent la taille de la cellule, la capacité de la membrane et la résistance du cytoplasme [52]. Comme exemple, les travaux de Senez *et al.* [53] présentent un microsystème constitué de deux électrodes et d'un microcanal, qui permet de localiser les cellules sur les électrodes. Le système est montré sur la Figure I. 16 ci-dessous.

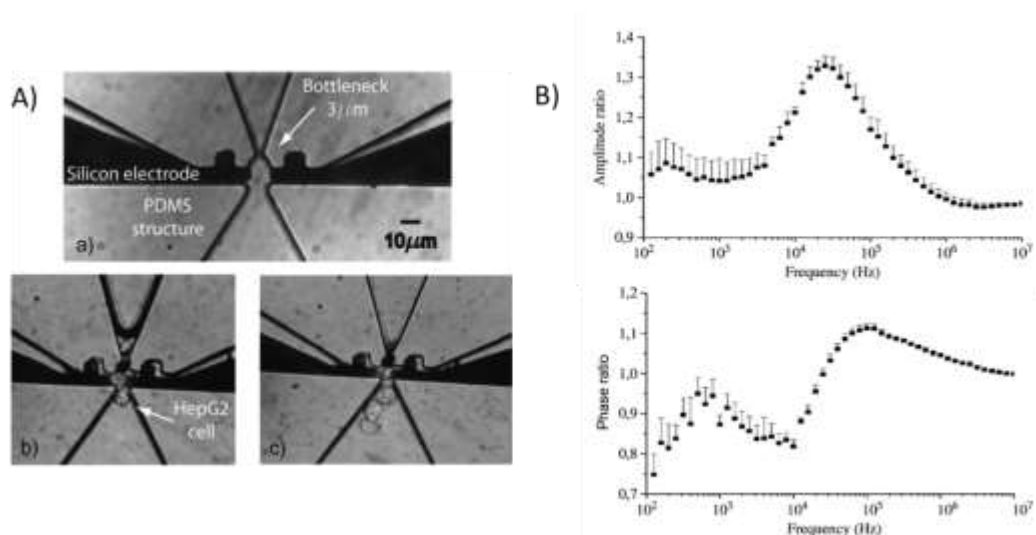


Figure I. 16 (a) Mesure un bio-impédance : photographie d'une cellule sur les électrodes, (a) les rapports normalisés de les amplitudes et les phases mesurées après l'insertion d'une cellule (reproduit de [53])

La méthode d'impédancemétrie montre la possibilité de détecter des cellules uniques sans marqueurs, basée sur l'étude de l'interaction ondes électriques/cellule. Or cette technique est généralement appliquée aux basses fréquences inférieures à 100 MHz. En effet, dans la gamme du MHz, les mesures effectuées traduisent une modification globale des propriétés diélectriques de la membrane (dispersion β). De plus, les mesures nécessitent toutefois un contact physique entre les électrodes et les cellules à étudier.

III.3.2.c.2 Détection aux Téraherz

En complémentarité, de nouvelles investigations ont cours dans le domaine du térahertz (100 GHz à 30 THz). Les travaux de l'IEMN (*Institut d'Electronique de*

Microélectronique et de Nanotechnologie) [54], [55] portent sur l'élaboration de différents biocapteurs dédiés à la caractérisation diélectrique de biomolécules. Nous pouvons voir sur la Figure I. 17, le système de détection est basé sur l'utilisation de lignes métalliques nanométriques dites lignes de Goubau qui s'appuient sur la génération d'impulsions ultracourtes pour sonder le milieu biologique. Les modifications d'impédance électriques observées traduisent une modification de la fonctionnalité de surface cellulaire et de la structure macromoléculaire de la cellule, survenant par exemple lors de l'internalisation⁴ ou l'interaction d'un ligand avec son récepteur.

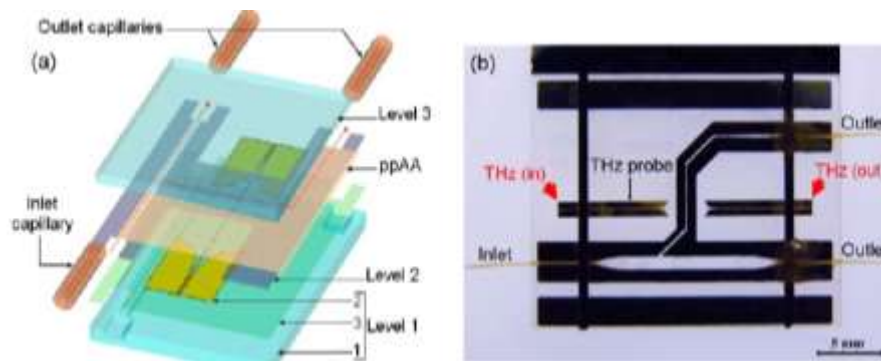


Figure I. 17 Système du BioMEMS TéraHertz : (a) les étapes de fabrication(a) vue du biocapteur reproduit de ([56])

⁴L'internalisation est un phénomène permettant l'entrée à l'intérieur d'une cellule eucaryote de molécules située à l'extérieur de la cellule ou sur la surface externe de la membrane au moyen de vésicules.

III.4 Potentialités de la technique de détection de cellule dans la gamme des hyperfréquences

En intermédiaire entre les basses fréquences utilisées par l'impédancemétrie et la gamme THz (Figure I. 18), se situent les ondes hyperfréquences. Les **hyperfréquences** (appelé également Micro-ondes) sont des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 0,3 GHz et 100 GHz.

Durant ces trente dernières années, en raison de l'apparition de nouvelles technologies, les sources électromagnétiques se sont multipliées et l'exposition quotidienne de l'homme à ces champs s'est d'autant plus accrue. Les applications exploitant les ondes électromagnétiques dans les domaines de la biologie et de la médecine sont nombreuses. Nous pouvons citer par exemple, l'application thérapeutique par micro-ondes hyperthermie [57], micro-onde ablation [58] ainsi d'autres applications telles que la radiométrie et télémétrie [59]. Les premières utilisations médicales des ondes électromagnétiques ont été conduites par l'institut de cancérologie et on s'en sert largement aujourd'hui, non pour combattre le cancer directement, mais pour aider l'organisme à résister aux radiations et à la chimiothérapie.

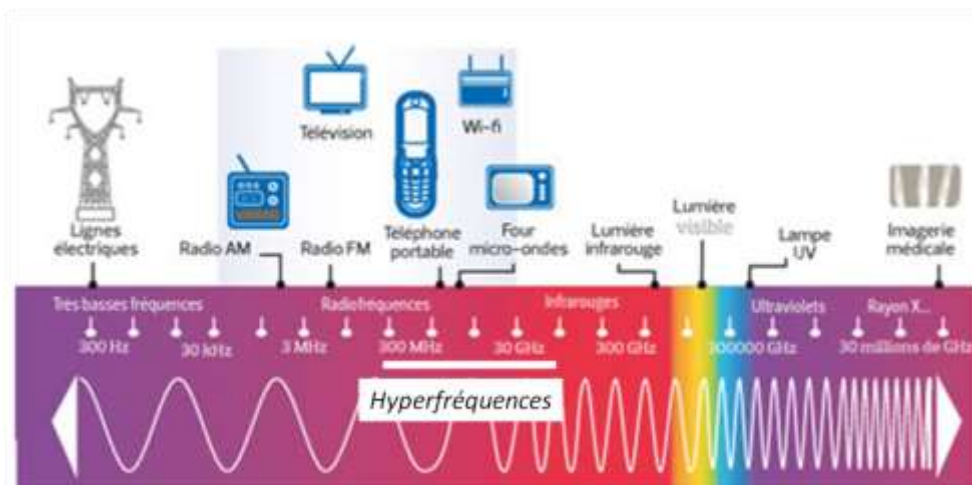


Figure I. 18 Le spectre électromagnétique et ses applications associées (reproduit de [60])

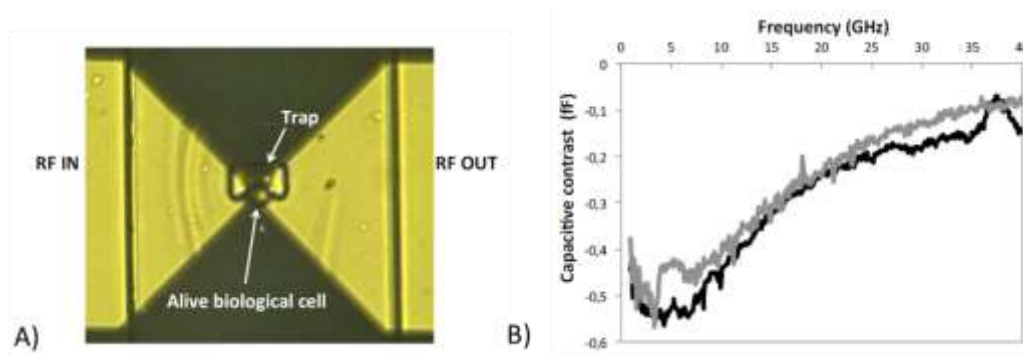
L'utilisation des ondes électromagnétiques pour caractériser et étudier les propriétés diélectriques de substances biologiques telles que des tissus ou des fluides biologiques (sang) est bien établie notamment grâce au travail du Pr. Schwan [6]. La détection hyperfréquence consiste à mesurer les propriétés diélectriques des milieux biologiques avec et sans changement physiologique et morphologique. Cette technique est non-invasive et non destructive. Dans les travaux de Gabriel *et al.* [12], [61], un grand nombre des milieux biologiques sont caractérisés aux fréquences des micro-ondes jusqu'à 20 GHz. Ils ont montré que la permittivité et la conductivité varient entre les différents milieux biologiques. D'autres travaux [62], [63] démontrent qu'il existe un contraste important entre les paramètres diélectriques de tissus sains et de

tissus cancéreux sur une large gamme de fréquence au-delà du gigahertz. Cependant, ces études ont été menées aux échelles des organes (foie par exemple) ou des tissus (échantillons centimétrique d'organe ou de peau).

Les investigations à l'échelle de cellule unique dans le domaine des hyperfréquences sont apparues très récemment. Dans cette gamme de fréquence (dispersion γ), la membrane plasmique est électriquement transparente, ce qui fait que les ondes hyperfréquences pénètrent à l'intérieur de la cellule. La technique de détection hyperfréquence est avantageuse, car non-invasive et non destructive. Les mesures sont sans marqueur et sans contact, ce qui permet de mesurer les cellules directement dans leur état naturel. Les mesures permettent de différencier les cellules vivantes et mortes et d'identifier le type cellulaire. La détection électrique hyperfréquence est effectuée en mesurant les coefficients de réflexion et de transmission de la cellule, à l'aide d'un système physique qui sert à guider les ondes électromagnétiques dit guide d'onde. Tout changement de comportement physiologique peut être exprimé en utilisant les paramètres S.

Les premiers travaux de détection de cellule unique dans la gamme hyperfréquence ont été initiés par l'équipe MH2F du LAAS via les travaux de thèse de Tong Chen *et al.* [64]. La détection large-bande (de 40 MHz à 40 GHz) des cellules uniques vivantes de lymphome B est effectuée directement dans leur milieu de culture (Figure I. 19). Le biocapteur hyperfréquence comporte un guide d'onde coplanaire avec une coupure capacitive au centre, ainsi qu'un canal microfluidique placé perpendiculairement au-dessus, et inclut un piège mécanique en son centre.

Figure I. 19 (a) Photographie d'une cellule de lymphome B vivante, qui est piégée dans le centre de la zone de



détection RF, (b) Spectres des deux cellules uniques vivantes (reproduit de [64])

Les travaux [65] présentent un interféromètre de 1,6 GHz basé sur l'utilisation d'une ligne de transmission pour la détection de la cellule unique (Figure I. 21). Les cellules de levures sont suspendues dans de l'eau salée. Un potentiel d'actionnement est appliqué aux électrodes qui génèrent alors une force diélectrophorétique (**DEP**, voir III.5) translatant la cellule sur les électrodes. Le dépassement de la cellule sur une paire d'électrodes interdigitées provoque une variation de capacité (ΔC).

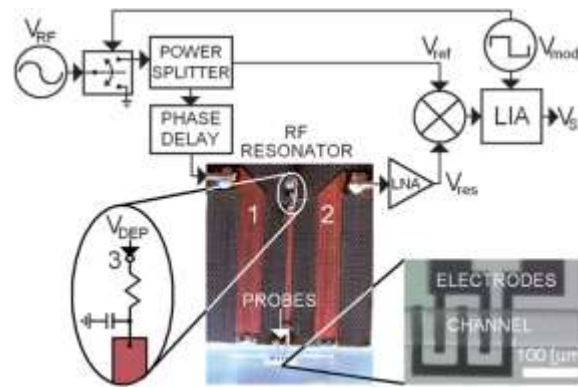


Figure I. 20 Interféromètre de 1,6 GHz dédié à la détection de cellules uniques circulées dans un canal microfluidique passant par une paire d'électrodes interdigitées (reproduit de [65])

Dans les travaux de Ning *et al.* [66], qui ont suivi, la détection de cellules vivantes de Jurkat en fonction de leur nombre est effectuée sur une plage de fréquence de 1 GHz à 5 GHz. Le microsystème est composé d'une ligne de transmission coplanaire et d'un canal microfluidique. Les cellules de Jurkat sont en suspension dans une solution de saccharose, et sont immobilisées entre les deux électrodes de la ligne de transmission par la méthode de diélectrophorèse.

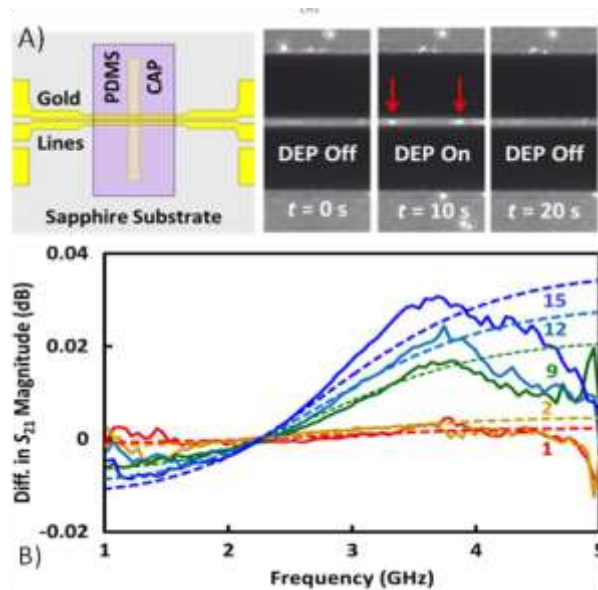


Figure I. 21 (a) Schématisation de la transmission coplanaire et le canal microfluidique et deux cellules de Jurkat vivantes piégées entre les lignes coplanaire, après l'application de la force DEP, (a) Coefficient de transmission S21 en mesure et simulation de 1, 2, 9, 12, et 15 cellules (reproduit de [66])

D'autre part, J. Leroy *et al.* [67] présente un biocapteur microfluidique basé sur une architecture de filtre passe-bande (5,6 GHz à 6 GHz) faite d'électrodes pour caractériser les propriétés diélectriques de cellules uniques. Les cellules suspendues dans une solution de saccharose circulant dans le canal microfluidique (Figure I. 22). L'immobilisation des cellules est également effectuée avec l'application d'une force DEP, ce qui impose l'utilisation d'un milieu hôte des cellules faiblement conducteur.

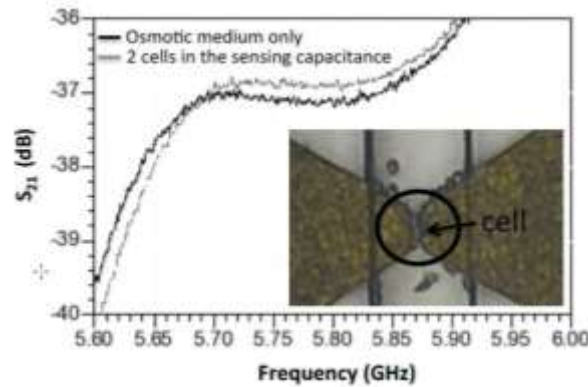


Figure I. 22 Mesure des paramètres S_{21} du biocapteur: avec uniquement du milieu hôte et avec deux cellules piégées (reproduit de [67])

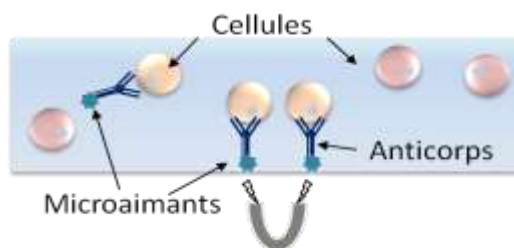
Parmi ces études à l'échelle de la cellule unique, le système de blocage de cellule unique apparaît très important car il impose des contraintes sur le milieu hôte de caractérisation des cellules. Lorsqu'une technique de DEP est utilisée, le milieu doit être appauvri vis à vis de sa conductivité. Nous avons donc étudié les possibles techniques de blocage de cellules individuelles.

III.5 Techniques de manipulation cellulaire

L'une des difficultés en microsystème est de pouvoir placer les cellules en suspension sur les zones de mesures. Pour cela, plusieurs méthodes « microfluidique-compatibles » existent, et sont classées suivant le type de force utilisée pour la manipulation. Certaines méthodes appliquées de l'extérieur sont des méthodes dites actives, nous pouvons citer les méthodes magnétique, mécanique, optiques, électriques [68]. Il existe également des méthodes qui exploitent uniquement la force hydrodynamique, sans faire appel à des champs externes. En voici quelques exemples brièvement introduits.

III.5.1 Techniques actives

Magnétiques Les manipulations sont basées sur l'utilisation des champs magnétiques et de micro particules magnétiques. Ces dernières ont typiquement un noyau magnétique et un revêtement non magnétique qui peut être adapté pour se lier à des anticorps spécifiques [69].



Mécaniques L'application principale de la manipulation mécanique est la séparation de cellules. Les cellules peuvent être aspirées dans des micropuits, puis être analysées ou cultivées individuellement [70] (Figure I. 23). Les cellules peuvent également être capturées puis déplacées par le système dit de micropince (*microgripper* en anglais) [71] (Figure I. 24). Néanmoins, la complexité des dispositifs mécaniques rend leur intégration difficile dans les biocapteurs.

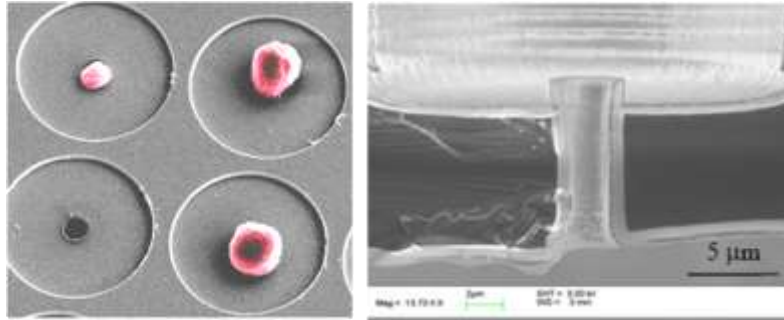


Figure I. 23 Images d'un micropuits pour l'immobilisation mécanique des cellules par l'aspiration (reproduit de [72])

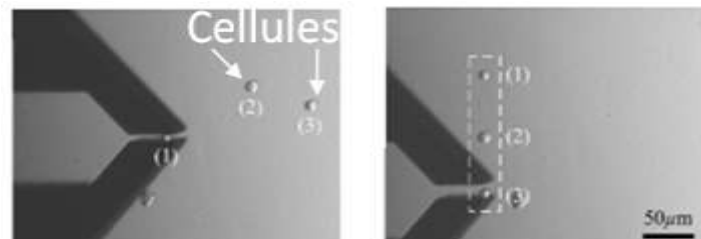


Figure I. 24 Exemple de capture et déplacement des cellules uniques par l'utilisation de la micropince (reproduit de [71])

Optiques Ces méthodes utilisent la force résultant de la réfraction d'un faisceau laser en milieu transparent, pour maintenir et déplacer physiquement des cellules. Elles permettent par exemple de séparer en flux les particules selon leur taille, forme et indice de réfraction et de générer des matrices de pièges optiques [73].

Les systèmes optiques présentent un intérêt majeur pour l'immobilisation et le déplacement de cellules uniques avec grande précision. Néanmoins, une manipulation prolongée dans un piège optique pourrait causer l'endommagement des cellules par la chaleur générée par l'énergie du laser.

Électroniques Ces méthodes reposent sur l'application d'un champ électrique pour engendrer une manipulation de particules ou cellules. Le phénomène de **diélectrophorèse (DEP)** implique le mouvement d'un corps dans un champ électrique non-uniforme, causé par la polarisabilité du corps (particule, cellule...). Un champ alternatif (AC) peut être utilisé pour polariser les objets non chargés. Une cellule possédant une permittivité plus élevée que celle du milieu se dirigera alors vers les régions de forte intensité du champ (et réciproquement).

Dans le travail de Voldman *et al.* [74] la force DEP a été utilisée pour confiner des cellules et les maintenir contre la perturbation des flux de fluide. Le réseau cellulaire

est composé d'électrodes extrudées à géométrie asymétrique quadripolaire et électriquement adressable (Figure I. 25).

Les méthodes employant la force DEP présentent quelques inconvénients. Elles peuvent causer un réchauffement des cellules dans le cas d'une manipulation prolongée. De plus, la DEP semble endommager les cellules piégées, ce qui affecte la prolifération cellulaire. D'autre part, elles exigent généralement que le milieu hôte de la suspension cellulaire soit appauvri en ions, ce qui n'est pas compatible avec les milieux traditionnels de culture de cellules [75], riches en ions et nutriments variés.

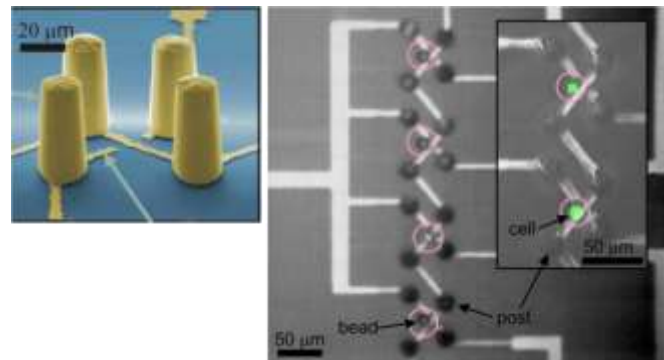


Figure I. 25 Piège DEP quadripôle extrudée (gauche) et le piégeage des billes et cellules (droite)(reproduit de [74])

Les méthodes de manipulation cellulaire actives reposent donc sur différentes approches et présentent toutes un certain nombre d'avantages et d'inconvénients. Certaines de ces méthodes sont relativement complexes et onéreuses tant pour l'équipement nécessaire à leur mise en œuvre, que pour les consommables utiles à leur réalisation.

Sans faire appel à des champs externes, il est également possible de manipuler des cellules en fonction de leur taille, forme, et propriétés mécaniques et chimiques. Ces techniques dites passives exploitent uniquement des propriétés d'hydrodynamique et sont d'autant plus efficaces et simples à intégrer.

III.5.2 Hydrodynamiques

Hydrodynamiques Ces méthodes utilisent généralement des microstructures et des valves spécifiques dans le canal microfluidique pour contrôler l'écoulement de fluide de manière à recueillir des cellules individuelles. Elles sont d'autant plus efficaces et simples à intégrer. Un bel exemple est proposé par Tan et Takeuchi [76]: leur système utilise les forces hydrodynamiques pour le transport et l'immobilisation d'un grand nombre de particules simultanément, et des forces optiques créant des micro-bulles pour la libération des particules individuelles (Figure I. 26). Or, la libération des particules basée sur la technique laser rend la manipulation complexe.

La libération des cellules exploitant uniquement les forces hydrodynamiques est présentée par Huebner *et al.* [77]. Leur système est composé d'un réseau de pièges

mécaniques basés sur le travail de Di Carlo [78], qui permet d'immobiliser efficacement une centaine des particules individuellement. Puis la libération de particules piégées est effectuée en inversant le sens du flux dans le micro canal (Figure I. 27).

Cette technique de manipulation cellulaire est particulièrement intéressante, sans besoin d'exploiter des forces externes, et donc sans ajout de dispositifs, ce qui rend la manipulation, la fabrication et l'intégration de tel dispositif considérablement plus simple à un biocapteur.

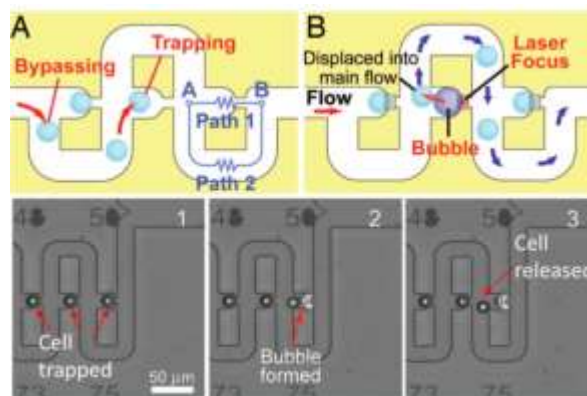


Figure I. 26 Mécanisme du piégeage hydrodynamique et libération des particules par création des micro-bulles par laser (reproduit de [76])

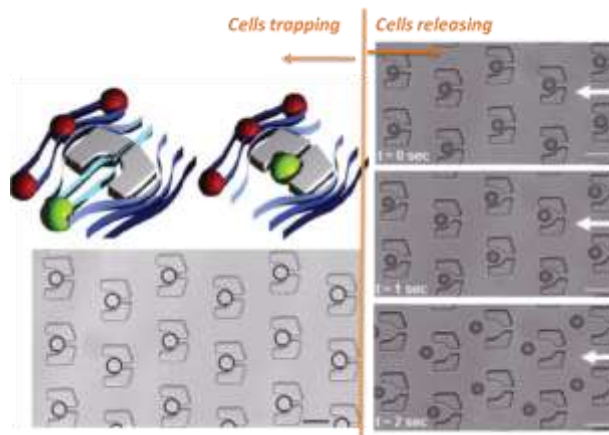


Figure I. 27 Pièges mécaniques et mécanisme de capture (gauche) et libération (droite) des particules utilisant uniquement la force hydrodynamique(reproduit de [77])

III.6 Discussion

Dans cette partie, nous avons vu différents biocapteurs dédiés à la détection et à la caractérisation des cellules uniques.

Les méthodes de détection mécanique sont sans utilisation de marqueur spécifique. Mais elles exigent une réalisation et une bio-fonctionnalisation de surface de poutres très délicates.

Les méthodes de détection optique traditionnelles de microscopie et cytométrie en flux sont très performantes et très spécifiques. Leurs caractéristiques les placent au premier plan d'utilisation de routine pour les biologistes. Elles présentent néanmoins des coûts importants et nécessite la préparation des échantillons au préalable. Quant à celles basées sur des phénomènes d'interaction ondes optique/matières biologiques, elles permettent de s'affranchir de l'utilisation de marqueurs spécifiques et d'ouvrir des perspectives de développement des outils pour la spectroscopie cellulaire.

Enfin, les méthodes de détection électrique ont été introduites. Ce sont des méthodes prometteuses pour de l'analyse cellulaire. Selon la gamme de fréquence utilisée, l'impédancemétrie montre essentiellement l'effet de la polarisation au niveau de la membrane plasmique dans la gamme du MHz, les méthodes de détection par spectroscopie TéraHertz exploitent des phénomènes de résonances moléculaires. Puis, nous avons abordé la technique de détection hyperfréquence permettant d'avoir une information intracellulaire, de façon non-invasive, non destructive, sans marqueur et sans contact.

Puis pour effectuer une analyse de cellule unique, il est essentiel d'immobiliser les cellules individuellement avant qu'une autre manipulation soit effectuée. Un bon choix de technique d'immobilisation cellulaire joue un rôle crucial dans la bonne performance du biocapteur. L'utilisation uniquement de la force hydrodynamique permet un piégeage de cellule efficace et une intégration simple aux biocapteurs.

IV Objectif de notre travail et conclusions

En complémentarité aux méthodes traditionnelles d'imagerie cellulaire, nous proposons d'exploiter une technique de caractérisation spectroscopique hyperfréquence large-bande (40 MHz à 40 GHz) à l'échelle cellulaire dédiée à l'observation en temps réel de cellules vivantes soumises à des stress d'ordre chimique. Cette technique permet en effet d'évaluer dans leur globalité des cellules en microenvironnement et d'en effectuer le suivi en temps réel de façon non invasive, sans ajout de fluorochromes ou colorants. De plus, conjointement à l'utilisation des microtechnologies, la micro-spectroscopie diélectrique HF donne accès à l'identification en temps réel de paramètres électriques de cellules vivantes, mortes, qu'elles soient en suspension ou en entité unique.

Le but de ces travaux de thèse est donc d'optimiser et de stabiliser la technique de mesure et les bio-capteurs HF/fluidiques précédemment développés dans l'équipe afin d'évaluer la signature diélectrique de cellules biologiques suivant différents états pathologiques, sur différentes durées, en fonction du niveau de sensibilité requis et des stress chimiques appliqués.

Bibliographie

- [1] H. A. Svahn and A. van den Berg, "Single cells or large populations?," *Lab. Chip*, vol. 7, no. 5, pp. 544–546, May 2007.
- [2] O. G. Bahcall, "Single cell resolution in regulation of gene expression," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 1, p. 2005.0015, Jun. 2005.
- [3] "Animal Cell." [Online]. Available: <http://biology.tutorvista.com/animal-and-plant-cells/animal-cell.html>.
- [4] S. J. Singer and G. L. Nicolson, "The fluid mosaic model of the structure of cell membranes," *Science*, vol. 175, no. 4023, pp. 720–731, Feb. 1972.
- [5] "Plasma Membrane." [Online]. Available: <http://biology.tutorvista.com/animal-and-plant-cells/plasma-membrane.html>.
- [6] H. P. Schwan, "Electrical properties of tissue and cell suspensions," *Adv. Biol. Med. Phys.*, vol. 5, pp. 147–209, 1957.
- [7] H. P. Schwan, "Electrical properties of blood and its constituents: alternating current spectroscopy," *Blut*, vol. 46, no. 4, pp. 185–197, Apr. 1983.
- [8] K. R. Foster and H. P. Schwan, "Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review," *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 17, no. 1, pp. 25–104, 1989.
- [9] James Clerk Maxwell, *A Treatise on Electricity & Magnetism - Volume 2*. 1954.
- [10] K. WAGNER, "Explanation of the dielectric fatigue phenomenon on the basis of Maxwell's concept," *Ark. Für Electrotech.*, vol. Edition Shering H. Berlin : Springer-Verlag, 1914.
- [11] H. P. Schwan, "Biophysical Principles of the Interaction of ELF Fields with Living Matter: I. Properties and Mechanism," in *Biological Effects and Dosimetry of Static and ELF Electromagnetic Fields*, M. Grandolfo, S. M. Michaelson, and A. Rindi, Eds. Springer US, 1985, pp. 221–241.
- [12] C. Gabriel, S. Gabriel, and E. Corthout, "The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey," *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, no. 11, p. 2231, 1996.
- [13] R. Hober, *PHYSICAL CHEMISTRY OF CELLS AND TISSUES*. J. & A. Churchill, 1947.
- [14] H. Fricke, *The theory of electrolytic polarization*. London: Taylor and Francis, 1932.
- [15] P. Debye, "Polar molecules.," *J. Soc. Chem. Ind.*, vol. 48, no. 43, pp. 1036–1037, Oct. 1929.
- [16] K. S. Cole and R. H. Cole, "Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics," *J. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 4, pp. 341–351, Apr. 1941.
- [17] "Kirby Research Group at Cornell: Microfluidics and Nanofluidics :." [Online]. Available: <http://www.kirbyresearch.com/index.cfm/wrap/textbook/microfluidicsnanofluidics.html>.
- [18] G. Karp, *Biologie cellulaire et moléculaire - Concepts et expériences*, 3th ed. 2010.
- [19] "Molecular Expressions Cell Biology: Mitosis with Fluorescence Microscopy - Cytokinesis." [Online]. Available: <https://micro.magnet.fsu.edu/cells/fluorescencemitosis/cytokinesisissmall.html>.
- [20] K. Kesikaho, R. Hieta, R. Sormunen, and J. Myllyharju, "Chlamydomonas reinhardtii Has Multiple Prolyl 4-Hydroxylases, One of Which Is Essential for Proper Cell Wall Assembly." [Online]. Available: <http://www.plantcell.org>.
- [21] E. C. Hayden, "Microscopic marvels: Microscope for the masses," *Nat. News*, vol. 459, no. 7247, pp. 632–633, Jun. 2009.
- [22] A. Moldavan, "Photo-electric technique for the counting of microscopical cells," *Science*, vol. 80, no. 2069, pp. 188–189, Aug. 1934.
- [23] cjourno, "La cytométrie en flux." [Online]. Available: <http://accres.ens-lyon.fr/accres/ressources/immunité-et-vaccination/cellules-immunes-et-organes-lymphoïdes/la-cytométrie-en-flux>.
- [24] B. Barlogie, M. N. Raber, J. Schumann, T. S. Johnson, B. Drewinko, D. E. Swartzendruber, W. Göhde, M. Andreeff, and E. J. Freireich, "Flow Cytometry in Clinical Cancer Research," *Cancer Res.*, vol. 43, no. 9, pp. 3982–3997, Sep. 1983.
- [25] G. Cordier, "Flow cytometry for immunology," *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.*, vol. 58, no. 2, pp. 147–150, 1986.
- [26] M. M. Goldsmith, D. H. Cresson, L. A. Arnold, D. S. Postma, F. B. Askin, and H. C. Pillsbury, "Part I. DNA Flow Cytometry as a Prognostic Indicator in Head and Neck Cancer," *Otolaryngol. -- Head Neck Surg.*, vol. 96, no. 4, pp. 307–318, Apr. 1987.
- [27] S. Fields, "The Interplay of Biology and Technology," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 18, pp. 10051–10054, 2001.
- [28] G. Paumier, "Interdisciplinarité, biologie et micro-nanotechnologies," 2008.

- [29] L. Zhou, Y. Shen, L. Jiang, D. Yin, J. Guo, H. Zheng, H. Sun, R. Wu, and Y. Guo, "Systems Mapping for Hematopoietic Progenitor Cell Heterogeneity," *PLOS ONE*, vol. 10, no. 5, p. e0126937, mai 2015.
- [30] G. Donati and F. M. Watt, "Stem cell heterogeneity and plasticity in epithelia," *Cell Stem Cell*, vol. 16, no. 5, pp. 465–476, May 2015.
- [31] S. Lindström and H. Andersson-Svahn, Eds., *Single-Cell Analysis - Methods and Protocols*, vol. 853. Totowa, NJ: Humana Press, 2012.
- [32] L. Charon, A. R. Wheeler, and L. Lilge, "Single Cell Analysis in Microfluidic Devices," in *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, D. L. Prof, Ed. Springer US, 2008, pp. 1851–1860.
- [33] K. C. Cheung and P. Renaud, "BioMEMS in medicine: diagnostic and therapeutic systems," in *Proceedings of 35th European Solid-State Device Research Conference, 2005. ESSDERC 2005.*, 2005, pp. 345–350.
- [34] T. K. Hsiai, S. K. Cho, P. K. Wong, M. Ing, M. Navab, S. Reddy, L. L. Demer, and C. M. Ho, "BioMEMS sensors for real-time shear stress on endothelial cell dynamics," in *Engineering in Medicine and Biology, 2002. 24th Annual Conference and the Annual Fall Meeting of the Biomedical Engineering Society EMBS/BMES Conference, 2002.Proceedings of the Second Joint*, 2002, vol. 3, pp. 1828–1829 vol.3.
- [35] R. Bashir, "BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 56, no. 11, pp. 1565–1586, Sep. 2004.
- [36] K. D. Wise and K. Najafi, "Microfabrication techniques for integrated sensors and microsystems," *Science*, vol. 254, no. 5036, pp. 1335–1342, Nov. 1991.
- [37] A. C. R. GRAYSON, R. S. SHAWGO, A. M. JOHNSON, N. T. FLYNN, Y. LI, M. J. CIMA, and R. LANGER, "A BioMEMS review: MEMS technology for physiologically integrated devices," *Proc. IEEE*, vol. 92, no. 1, pp. 6–21, Jan. 2004.
- [38] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, Jul. 2006.
- [39] A. Manz, N. Graber, and H. M. Widmer, "Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing," *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 1, no. 1, pp. 244–248, Jan. 1990.
- [40] R. R. Jivani, G. J. Lakhtaria, D. D. Patadiya, L. D. Patel, N. P. Jivani, and B. P. Jhala, "Biomedical microelectromechanical systems (BioMEMS): Revolution in drug delivery and analytical techniques," *Saudi Pharm. J.*, vol. 24, no. 1, pp. 1–20, Jan. 2016.
- [41] W. Wang and S. A. Soper, *Bio-MEMS: Technologies and Applications*. CRC Press, 2006.
- [42] C. Dejous, "Contribution à l'étude de microcapteurs à ondes acoustiques visant la biodétection rapide sur site," thesis, Université Sciences et Technologies - Bordeaux I, 2005.
- [43] J. Fritz, M. K. Baller, H. P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H.-J. Güntherodt, C. Gerber, and J. K. Gimzewski, "Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics," *Science*, vol. 288, no. 5464, pp. 316–318, Apr. 2000.
- [44] J. L. Tan, J. Tien, D. M. Pirone, D. S. Gray, K. Bhadriraju, and C. S. Chen, "Cells lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force." [Online]. Available: <http://www.pnas.org>. [Accessed: 30-May-2016].
- [45] D. L. Stokes, G. D. Griffin, and T. Vo-Dinh, "Detection of E. coli using a microfluidics-based antibody biochip detection system," *Fresenius J. Anal. Chem.*, vol. 369, no. 3–4, pp. 295–301, Feb. 2001.
- [46] D. A. Bartholomeusz, J. D. Andrade, and A. B. Frazier, "Bioluminescent based chemchip for point-of-care diagnostics," 2000, pp. 602–606.
- [47] M. R. Soboleski, J. Oaks, and W. P. Halford, "Green fluorescent protein is a quantitative reporter of gene expression in individual eukaryotic cells.," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 19, no. 3, pp. 440–442, Mar. 2005.
- [48] T. D. Craggs, "Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 10, pp. 2865–2875, Oct. 2009.
- [49] X. M. Z. W. Z. Song, "Refractive index measurement of single living cells using on-chip Fabry-Érot cavity," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 89, no. 20, pp. 203901-203901–3, 2006.
- [50] H. Shao, D. Kumar, and K. L. Lear, "Single cell detection capability of an optofluidic spectroscopic biosensor," in *IEEE Sensors, 2005.*, 2005, p. 4 pp.-pp.
- [51] X. J. Liang, A. Q. Liu, C. S. Lim, T. C. Ayi, and P. H. Yap, "Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip," *Sens. Actuators Phys.*, vol. 133, no. 2, pp. 349–354, Feb. 2007.
- [52] S. Gawad, L. Schild, and P. H. Renaud, "Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing," *Lab. Chip*, vol. 1, no. 1, pp. 76–82, Sep. 2001.

- [53] V. Senez, T. Akalin, S. Arscott, N. E. Bourzgui, B. Bocquet, T. Fujii, E. Lennon, and T. Yamamoto, "‘Top Down’ Approaches for the Study of Single-Cells: Micro-Engineering and Electrical Phenotype," *Adv. Sci. Technol.*, vol. 53, pp. 97–106, 2006.
- [54] A. Treizebré, B. Bocquet, D. Legrand, and J. Mazurier, "Cell investigation by Terahertz BioMEMS," *Conf. Proc. Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. Annu. Conf.*, vol. 1, pp. 3509–3512, 2006.
- [55] A. TREIZEBRE, *BioMEMSTérahertz pour la caractérisation d’entités biologiques*. Editions universitaires europeennes, 2010.
- [56] A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, N.-E. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko, and B. Bocquet, "Cold plasma functionalizedTeraHertzBioMEMS for enzyme reactionanalysis," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, no. 1, pp. 154–160, Sep. 2009.
- [57] O. S. Nielsen, M. Horsman, and J. Overgaard, "A future for hyperthermia in cancer treatment?," *Eur. J. Cancer*, vol. 37, no. 13, pp. 1587–1589, Sep. 2001.
- [58] M. G. Lubner, C. L. Brace, J. L. Hinshaw, and F. T. Lee, "Microwave Tumor Ablation: Mechanism of Action, Clinical Results and Devices," *J. Vasc. Interv.Radiol. JVIR*, vol. 21, no. 8 Suppl, pp. S192–S203, Aug. 2010.
- [59] P. R. Stauffer, B. W. Snow, D. B. Rodrigues, S. Salahi, T. R. Oliveira, D. Reudink, and P. F. Maccarini, "Non-invasive measurement of brain temperature with microwave radiometry: demonstration in a head phantom and clinical case," *Neuroradiol. J.*, vol. 27, no. 1, pp. 3–12, Feb. 2014.
- [60] "Définition globale d’une onde électromagnétique." [Online]. Available: <http://tpeondeselectro.e-monsite.com/pages/l-onde-en-general/differents-types-d-ondes/haute-frequence.html>.
- [61] S. Gabriel, R. W. Lau, and C. Gabriel, "The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz," *Phys. Med. Biol.*, vol. 41, no. 11, p. 2251, 1996.
- [62] U. A. Khan, N. Al-Moayed, N. Nguyen, K. A. Korolev, M. N. Afsar, and S. P. Naber, "Broadband Dielectric Characterization of Tumorous and Nontumorous Breast Tissues," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 55, no. 12, pp. 2887–2893, Dec. 2007.
- [63] A. P. O’Rourke, M. Lazebnik, J. M. Bertram, M. C. Converse, S. C. Hagness, J. G. Webster, and D. M. Mahvi, "Dielectric properties of human normal, malignant and cirrhotic liver tissue: in vivo and ex vivo measurements from 0.5 to 20 GHz using a precision open-ended coaxial probe," *Phys. Med. Biol.*, vol. 52, no. 15, pp. 4707–4719, Aug. 2007.
- [64] T. Chen, F. Artis, D. Dubuc, J.-J.Fournie, M. Poupot, and K. Grenier, "Microwave biosensor dedicated to the dielectric spectroscopy of a single alive biological cell in its culture medium," 2013, pp. 1–4.
- [65] G. A. Ferrier, S. F. Romanuik, D. J. Thomson, G. E. Bridges, and M. R. Freeman, "A microwave interferometric system for simultaneous actuation and detection of single biological cells," *Lab. Chip*, vol. 9, no. 23, pp. 3406–3412, Dec. 2009.
- [66] Y. Ning, C. Multari, X. Luo, C. Palego, X. Cheng, J. C. M. Hwang, A. Denzi, C. Merla, F. Apollonio, and M. Liberti, "Broadband Electrical Detection of Individual Biological Cells," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 62, no. 9, pp. 1905–1911, Sep. 2014.
- [67] J. Leroy, F. Hjeij, C. Dalmay, C. Mélin, F. Lalloue, S. Battu, M. O. Jauberteau, C. Lautrette, A. Bessaoudou, P. Blondy, and A. Pothier, "High frequency microfluidic biosensors for intracellular dielectric spectroscopy," in *2015 IEEE MTT-S International Microwave Symposium*, 2015, pp. 1–4.
- [68] H. Yun, K. Kim, and W. G. Lee, "Cell manipulation in microfluidics," *Biofabrication*, vol. 5, no. 2, p. 22001, Jun. 2013.
- [69] Y. Shen, B. Yao, and Q. Fang, "Application of Magnetic Control Technique in Microfluidic Chips," *ResearchGate*, vol. 22, no. 1, pp. 133–139, Jan. 2010.
- [70] T. Lehnert, M. a. M. Gijs, R. Netzer, and U. Bischoff, "Realization of hollow SiO₂ micronozzles for electrical measurements on living cells," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 81, no. 26, pp. 5063–5065, Dec. 2002.
- [71] N. Chronis and L. P. Lee, "Polymer MEMS-based microgripper for single cell manipulation," in *Micro Electro Mechanical Systems, 2004. 17th IEEE International Conference on. (MEMS)*, 2004, pp. 17–20.
- [72] M. Hosokawa, T. Hayata, Y. Fukuda, A. Arakaki, T. Yoshino, T. Tanaka, and T. Matsunaga, "Size-selective microcavity array for rapid and efficient detection of circulating tumor cells," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 15, pp. 6629–6635, Aug. 2010.
- [73] K. Ramser and D. Hanstorp, "Optical manipulation for single-cell studies," *J. Biophotonics*, vol. 3, no. 4, pp. 187–206, Apr. 2010.

- [74] J. Voldman, M. L. Gray, M. Toner, and M. A. Schmidt, "A microfabrication-based dynamic array cytometer," *Anal. Chem.*, vol. 74, no. 16, pp. 3984–3990, Aug. 2002.
- [75] A. Ahmad Khalili and M. R. Ahmad, "Numerical Analysis of Hydrodynamic Flow in Microfluidic Biochip for Single-Cell Trapping Application," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 11, pp. 26770–26785, Nov. 2015.
- [76] W.-H. Tan and S. Takeuchi, "A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 104, no. 4, pp. 1146–1151, Jan. 2007.
- [77] A. Huebner, D. Bratton, G. Whyte, M. Yang, A. J. Demello, C. Abell, and F. Hollfelder, "Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays," *Lab. Chip*, vol. 9, no. 5, pp. 692–698, Mar. 2009.
- [78] D. Di Carlo, N. Aghdam, and L. P. Lee, "Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 14, pp. 4925–4930, Jul. 2006.

Chapitre II : Optimisation du biocapteur dédié à l'analyse par spectroscopie diélectrique micro-onde de cellule individuelle

Dans ce chapitre, nous allons d'abord introduire le concept du biocapteur dédié à la spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules biologiques uniques, que nous appellerons par la suite biocapteur à cellule unique. Ensuite, nous allons montrer les optimisations effectuées sur le banc de test, la micro fabrication du bio-capteur, l'efficacité du piégeage des particules/cellules du biocapteur, puis nous détaillerons les optimisations paramétriques électromagnétiques du biocapteur réalisées pour augmenter sa sensibilité.

I Description du système de spectroscopie diélectrique

I.1 Concept du biocapteur micro-onde initial à cellule unique

Le biocapteur à cellule unique initial que nous allons présenter dans ce chapitre a été précédemment conçu et réalisé au sein de l'équipe [1]. Le biocapteur est composé de trois parties, comme montré sur la Figure II. 1.

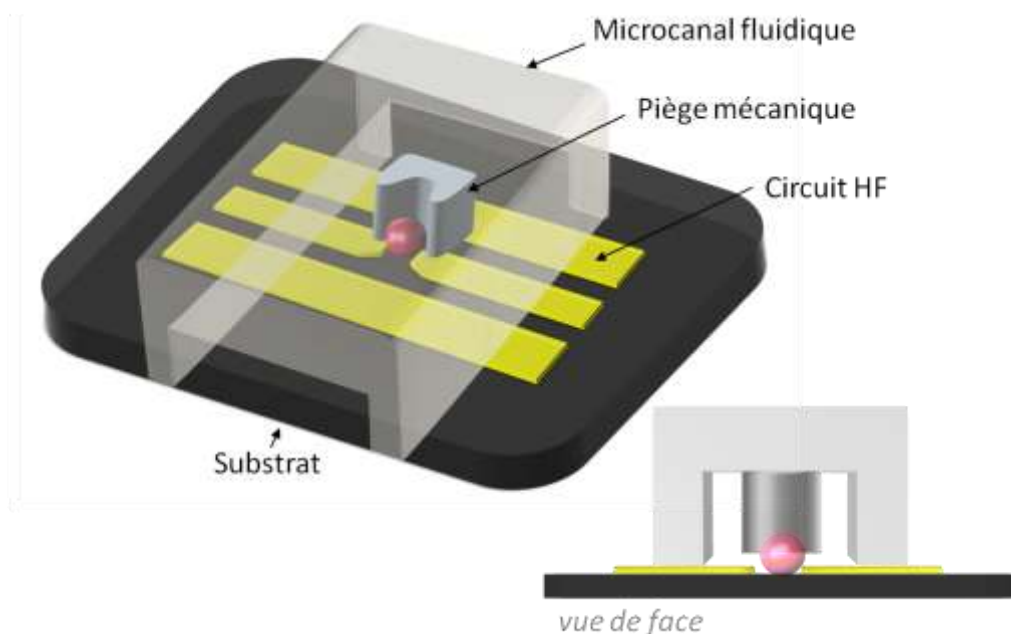


Figure II. 1 Schémas 3D du biocapteur micro-onde à cellule unique avec une particule piégée (représentée par la bille rouge)

- **le substrat quartz** : le quartz est avantageux pour ses propriétés optique et diélectrique. La transparence du substrat est importante pour une observation de la cellule piégée au microscope à statif inversé qui est largement utilisé dans les laboratoires des biologistes. Et le quartz est un matériau pur de silice fondu SiO_2 , qui a une valeur de permittivité relative constante et indépendante de la fréquence, à faible perte,
- **le circuit HF** : il est basé sur une ligne coplanaire **CPW** (Coplanar Waveguide), qui est avantageuse par rapport à d'autres structures planaires tels que microruban et stripline [2]. Les travaux [3], [4] ont démontré que le CPW est moins dispersif que la technologie microruban et son impédance reste constante jusqu'à 40 GHz (notre gamme de fréquence de mesure).

La ligne CPW est constituée d'un ruban métallique central (Signal), et de deux plans de masses, qui se situent symétriquement aux deux côtés du ruban Signal. Dans notre cas, la métallisation CPW est composée de titane (500 Å d'épaisseur) et d'or (300 nm d'épaisseur). Cette fine épaisseur du CPW a pour but d'assurer une bonne adhésion du canal fluidique sur les circuits HF, en minimisant toute fuite au détriment de pertes conductrices plus importantes dans la gamme hyperfréquence du fait de l'effet de peau⁵. Ceci n'est néanmoins pas gênant étant donné les pertes importantes du matériau à analyser à forte teneur en eau et donc à fortes pertes. Au centre de la structure CPW se situe une coupure capacitive (gap capacitif) qui présente une largeur de 10 μm . Le conducteur central est progressivement rétréci afin de réduire la zone de détection à la taille d'une cellule unique (10 -20 μm de diamètre pour la plupart des cellules cancéreuses),

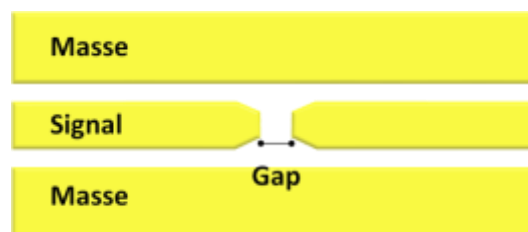


Figure II. 2 Vue du circuit HF

- **le canal fluidique et le piège mécanique** : ils sont réalisés en polymère (le détail de fabrication est présenté dans la section III). Le canal microfluidique de 50 μm de hauteur est placé perpendiculairement au-dessus du circuit HF. En son centre, un piège mécanique est utilisé pour immobiliser précisément une cellule juste au-dessus de la coupure capacitive, où les champs électromagnétiques sont focalisés.

Le mécanisme de piégeage hydrodynamique est présenté sur la Figure II. 3:

⁵L'effet de peau : est la tendance d'un courant électrique alternatif (CA) à se répartir dans un conducteur de telle sorte que la densité de courant à proximité de la surface du conducteur est supérieure à celle en son centre[5].

- entre le substrat et le fond du piège, un espacement permet le passage d'une fraction de fluide⁶. Grâce à cette fraction de fluide, les cellules introduites dans le microcanal et qui arrivent face au piège sont dirigées vers le piège mécanique vide par la force hydrodynamique,
- l'écoulement du fluide contribue à maintenir la cellule dans le piège. Cette cellule piégée obstrue l'espacement sous le piège, ce qui dévie toutes les autres cellules arrivant ultérieurement.

La libération des cellules piégées s'effectue par l'inversion du sens de l'écoulement des flux dans le canal. Cette opération permet de mesurer plusieurs cellules uniques (jusqu'à une quarantaine) avec un seul composant.

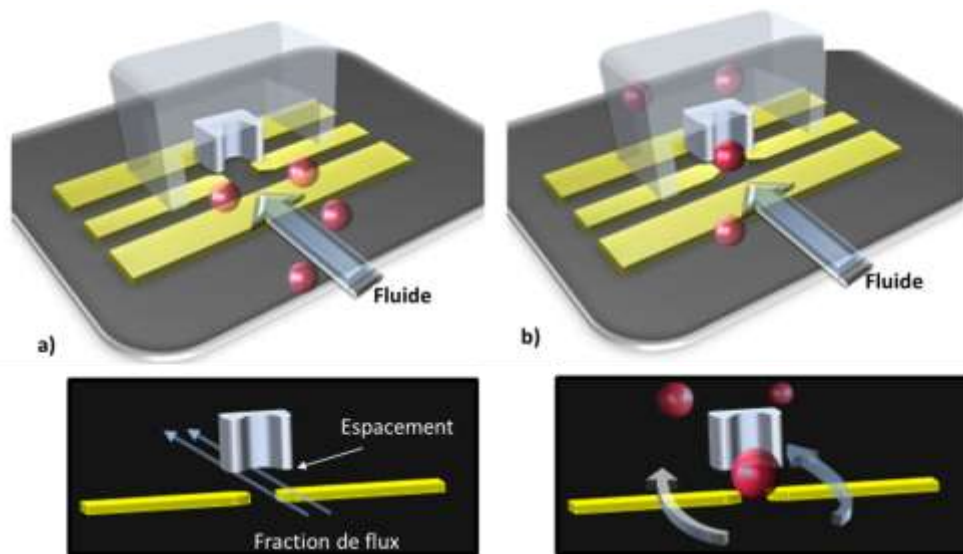


Figure II. 3 Le mécanisme de piégeage hydrodynamique : (a) piège mécanique vide et des cellules présentes dans le microcanal, (b) une cellule piégée et déviation des autres cellules

I.2 Matériels et méthodes

I.2.1 Méthode de mesure

Chaque matériau présente des caractéristiques électromagnétiques qui dépendent de ses propriétés diélectriques. Nous considérons par la suite uniquement des matériaux non-magnétiques. Dans le domaine hyperfréquence, les propriétés diélectriques d'un matériau sont déterminées en fonction de la fréquence et décrites par Equation. II - 1 :

$$\varepsilon(f) = \varepsilon_0 \varepsilon_r(f) \quad \text{Equation. II - 1}$$

⁶ Le concept du piège mécanique est détaillé dans la section IV.

Où ε_0 est la permittivité du vide, elle est constante. ε_r est la permittivité relative complexe. Les diélectriques sont souvent avec pertes, la permittivité relative complexe peut donc être décrite par Equation. II - 2 :

$$\varepsilon_r(f) = \varepsilon'_r(f) - j\varepsilon''_r(f) \quad \text{Equation. II - 2}$$

Avec la partie réelle (ε'_r) de la permittivité relative complexe qui se présente la capacité du stockage d'énergie électrique dans le matériau, et la partie imaginaire (ε''_r) de la permittivité relative complexe qui jauge les pertes diélectriques et de conductivité électrique. Il présente la dissipation d'énergie dans le matériau au champ électrique externe lui a appliqué.

La méthode de mesure consiste à mesurer les paramètres de dispersion complexes, appelés également paramètres S (de l'anglais Scattering parameters), du circuit intégrant le matériau sous test avec un analyseur de réseau vectoriel (**Vector Network Analyzer – VNA** en anglais), sur une plage de fréquence de 40 MHz à 40 GHz.

La conversion des paramètres S en propriétés diélectriques complexes est faite par l'intermédiaire des matrices ABCD et Y (voir les équations données à l'Annexe 1). À partir de la matrice Y sont calculées la **capacité (C)** et **conductance (G)** de la zone d'analyse située aux alentours du gap capacitif. Les calculs sont effectués en utilisant un programme exécuté par le logiciel de calcul scientifique Matlab®. Les travaux [1] précédemment réalisés dans l'équipe démontrent le lien entre l'admittance complexe (donc : capacité (C) et conductance (G)) et les paramètres permittivités du matériau sous test. Lorsque le biocapteur est chargé de milieu liquide, la capacité et la conductance du biocapteur sont :

$$C_{milieu} = \varepsilon_0 * \frac{\varepsilon'_{milieu} + \varepsilon'_{quartz}}{2} * K \quad \text{Equation. II - 3}$$

$$G_{milieu} = \varepsilon_0 * \frac{\varepsilon''_{milieu} + \varepsilon''_{quartz}}{2} * K * 2\pi f \quad \text{Equation. II - 4}$$

Où le K est un coefficient qui ne dépend que de la distribution des champs électromagnétiques du biocapteur. Par ailleurs, l'équation. II-4 peut être simplifiée en négligeant ε''_{quartz} devant $\varepsilon''_{liquide}$.

De la même manière, lorsque le biocapteur est mesuré avec une particule piégée suspendue dans la même liquide, nous avons :

$$C_{particule+milieu} = \varepsilon_0 * \left[\varepsilon'_{milieu} * \left(\frac{1}{2} - A \right) + \varepsilon'_{particule} * A + \frac{\varepsilon'_{quartz}}{2} \right] * K$$

Equation. II - 5

$$G_{particule+milieu} = \varepsilon_0 * \left[\varepsilon''_{liquide} * \left(\frac{1}{2} - A \right) + \varepsilon''_{particule} * A \right] * K * 2\pi f$$

Equation. II - 6

Le coefficient A correspond à la proportion des lignes de champs électriques dans la particule, et donc (1-A) correspond à la proportion des lignes dans le milieu liquide.

I.2.2 Banc de test

Le banc de test est montré à la Figure II. 4, il est composé de :

- un appareil de mesure des paramètres S : **VNA** (Anritsu Série 37000). Le biocapteur est connecté au VNA par l'intermédiaire des pointes, permettant l'interconnexion ainsi que de câbles coaxiaux,
- un ordinateur de bureau qui communique avec le VNA à l'aide d'une interface Humaine-Machine Matlab®. Elle permet d'acquérir et de traiter les données de mesure, et de plus d'afficher les résultats en temps réel,
- un pousse-seringue qui contrôle précisément le débit constant du flux dans le canal microfluidique avec une vitesse déterminée,
- un microscope muni d'une caméra CCD connectée à un écran qui permet d'observer l'état du canal fluide et du piège mécanique.



Figure II. 4 Banc de test biocapteur microfluidique

I.2.3 Extraction des paramètres diélectriques

Avant chaque test, nous effectuons une calibration SOLT (Short-Open-Load-Through) du système : VNA + câbles + pointes. Cette opération mène les plans de mesure au niveau des contacts des pointes, c'est-à-dire aux extrémités du circuit HF. L'ensemble du procédé d'extraction des paramètres est réalisé par un programme

Matlab de manière automatique. Nous décrivons ci-après le principe et les étapes essentielles de ce procédé d'extraction.

Schéma électrique équivalent

Nous mesurons l'ensemble des éléments du biocapteur c'est-à-dire 'la ligne accès – la paroi du microcanal – **le matériau cible** – la paroi du microcanal – la ligne accès'. Afin de faciliter la compréhension, le schéma électrique équivalent du biocapteur est établi comme montré sur la Figure II. 5.

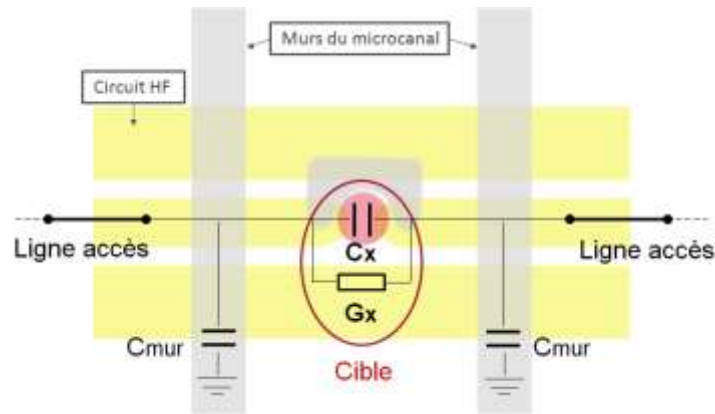


Figure II. 5 Schéma électrique équivalent du biocapteur

Procédé De-embedding

Pour extraire l'admittance complexe du matériau cible à partir des paramètres S mesurés, nous appliquons d'abord un procédé dit 'de-embedding' afin d'éliminer l'effet des autres éléments présents. Ce procédé est décrit ci-dessous et illustré à la Figure II. 6 qui présente les paramètres de réflexion et transmission mesurés et ainsi modélisés.

- Nous mesurons dans un premier temps une structure composée uniquement du circuit HF, ce que nous appelons 'THRU-sans-canal'. Cela nous permet de déterminer la longueur électrique, les pertes et l'impédance caractéristique des lignes accès coplanaires.
- Nous mesurons ensuite une structure composée du circuit HF muni du microcanal fluide qui est modélisé par deux condensateurs, ce que nous appelons 'THRU-avec-canal'. Sachant que les caractéristiques des lignes accès ont été déterminées dans l'étape précédente, nous déterminons cette fois les capacités parasites des murs du microcanal ainsi que l'impédance caractéristique des lignes accès re-optimisée.

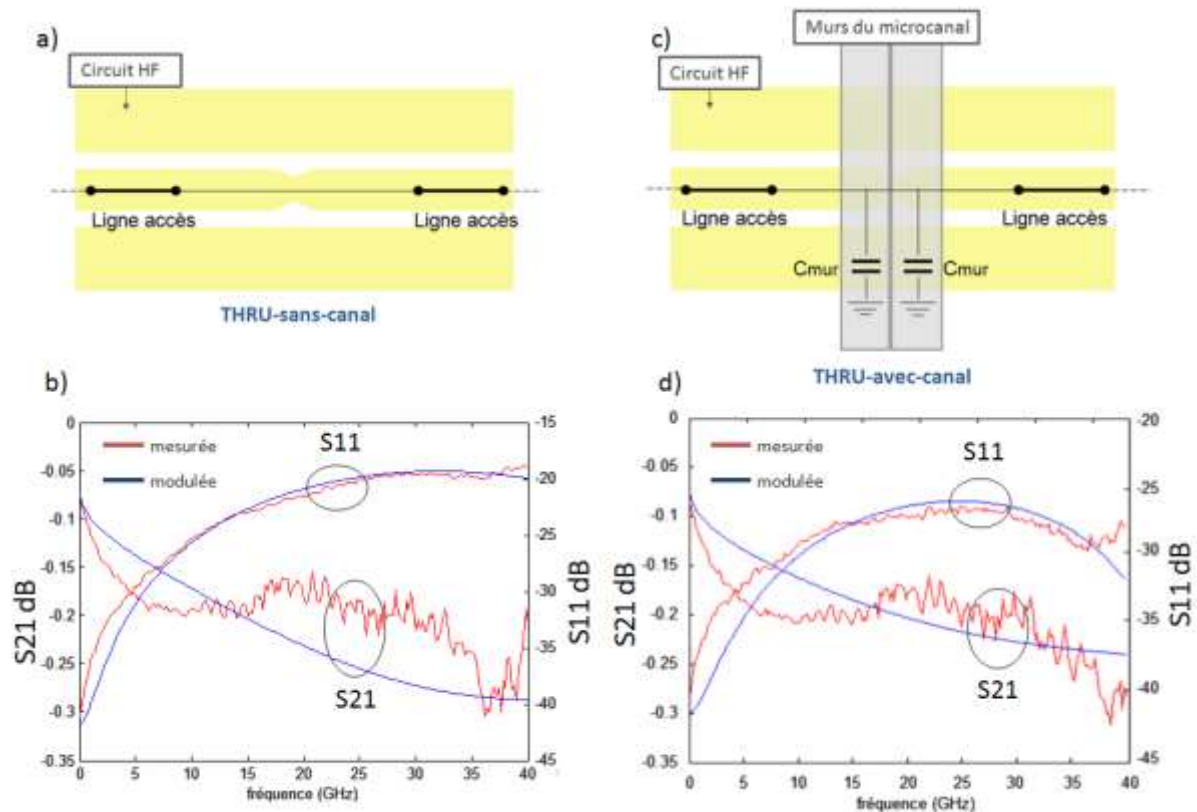


Figure II. 6 Procédé 'de-embedding' : (a) et (b) : schéma électrique et paramètres de réflexion et transmission mesurés (rouge) et modélisés (bleu) de la structure 'THRU-sans-canal', (c) et (d) : schéma électrique et paramètres de réflexion et transmission mesurés (rouge) et modélisés (bleu) de la structure 'THRU-avec-canal'

Extraction C_x et G_x

Après avoir effectué le procédé 'de-embedding', nous effectuons ensuite l'extraction de l'admittance complexe : C_x et G_x du matériau cible. La Figure II. 7 montre deux mesures effectuées : de l'eau déionisée (DI) et une bille de polystyrène de diamètre de 10 μm piégée dans de l'eau DI. La bille de polystyrène présente l'avantage d'être un modèle simple avec des valeurs de permittivité et de conductivité constantes et connues.

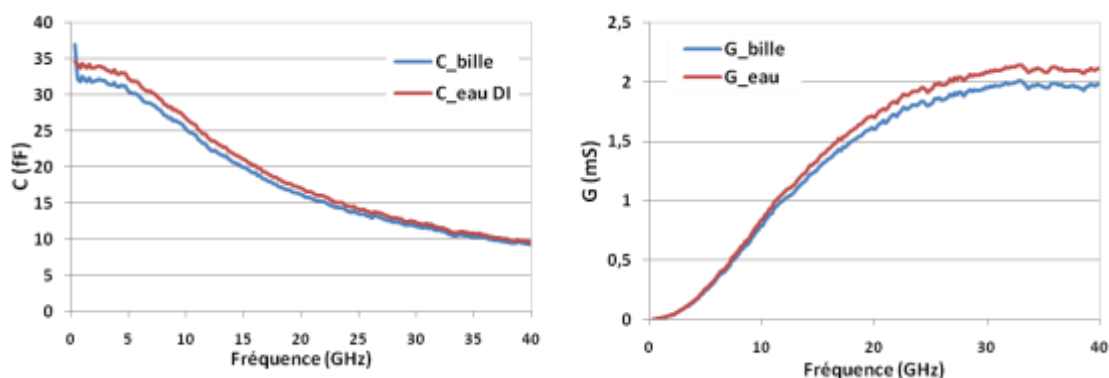


Figure II. 7 Capacité (gauche) et conductance (droite) mesurées de l'eau DI et d'une bille dans de l'eau DI

Contrastes diélectriques

Cependant, pour une mesure de la particule en suspension dans son milieu hôte, l'admittance complexe extraite présente l'ensemble de ces deux éléments : particule + milieu hôte. Afin de distinguer la contribution de la particule de celle du milieu hôte, nous définissons les contrastes capacitif et conductif de la particule dans son milieu hôte (Equation. II - 5 et Equation. II - 6), par rapport au milieu hôte seul (Equation. II - 3 et Equation. II - 4) :

$$\begin{aligned}\Delta C &= C_{particule+milieu} - C_{milieu} \\ &= \varepsilon_0 * (\varepsilon'_{particule} - \varepsilon'_{milieu}) * A * K\end{aligned}\quad \text{Equation. II - 7}$$

$$\begin{aligned}\Delta G &= G_{particule+milieu\ hôte} - G_{milieu\ hôte} \\ &= \varepsilon_0 * (\varepsilon''_{particule} - \varepsilon''_{milieu}) * A * K * 2\pi f\end{aligned}\quad \text{Equation. II - 8}$$

Validation de l'extraction des contrastes diélectriques

Afin de valider notre approche d'extraction des contrastes diélectriques, nous avons comparé les résultats issus des mesures et des simulations électromagnétiques effectuées à l'aide du logiciel HFSS® pour une bille de polystyrène (10 µm) dans de l'eau DI. Les résultats des simulations et mesures obtenues sont présentés sur la Figure II. 8. Le niveau 'zéro' présente la référence, qui est pour ce cas de l'eau DI. Nous pouvons voir que les valeurs maximales des contrastes capacitif et conductif sont obtenues alentours de 5 GHz et 40 GHz respectivement.

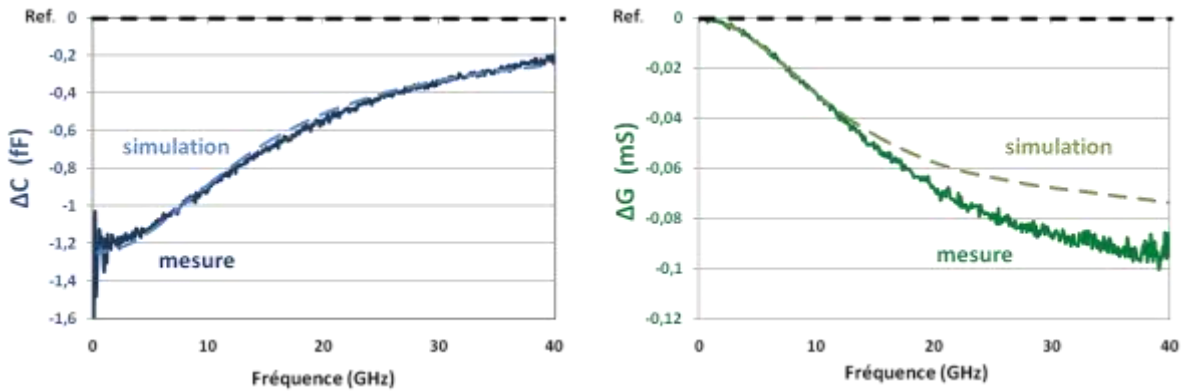


Figure II. 8 Comparaison simulation (courbes en pointées)/mesures (courbes pleines) des contrastes capacitif et conductif d'une bille de polystyrène de diamètre de 10 µm dans de l'eau DI

Nous avons obtenu une bonne concordance entre simulations et mesures pour les contrastes capacitif et conductif. Par ailleurs, une différence entre la mesure et la simulation apparaît sur le contraste conductif au-dessus de 15 GHz. Il peut être attribué à d'autres pertes induites par des composés résiduels présents dans la solution hôte des billes. Les résultats sont cependant assez similaires et permettent de valider notre méthode de simulation.

II Automatisation du banc de test

Nous avons mis en place une interface homme-machine (IHM) Matlab®, afin de d'améliorer la facilité d'utilisation du banc de test ainsi que la productivité et le rendement des mesures. Cette Interface HM prend en charge en temps réel:

- la communication entre le PC et l'appareil de mesure VNA,
- les acquisitions et enregistrements des données de mesures brutes,
- les traitements des données et l'affichage les résultats des mesures.

II.1 Interface Homme-Machine

L'interface HM est montrée à la Figure II. 9, elle est composée d'une partie des fonctions d'acquisition et d'une partie d'affichage des résultats :

Fonctions d'acquisition incluses : Elles se situent sur la partie gauche de l'interface.

- **Initialisation** : elle propose de lancer une nouvelle mesure et de créer un nouveau dossier nommé 'date – nom du composant'. L'utilisateur doit rentrer la cible à mesurer et son milieu hôte.
- **Procédé De-embedding** : cette étape de prétraitement du biocapteur est présentée précédemment, cette fonction analyse et enregistre les paramètres de deux structures THRU.
- **Acquisition et traitement** : Les fichiers de données brutes sont enregistrés sous forme de 'nom-numéro du test' et stockés dans le dossier de mesure créé. Le traitement des données brutes est déclenché par un clic sur le bouton 'Up'. Cette fonction vérifie d'abord l'existence de deux fichiers de la cible et du milieu hôte.
- **État de sauvegarde** : cette fonction indique les derniers enregistrements des données brutes de la cible et du milieu hôte.

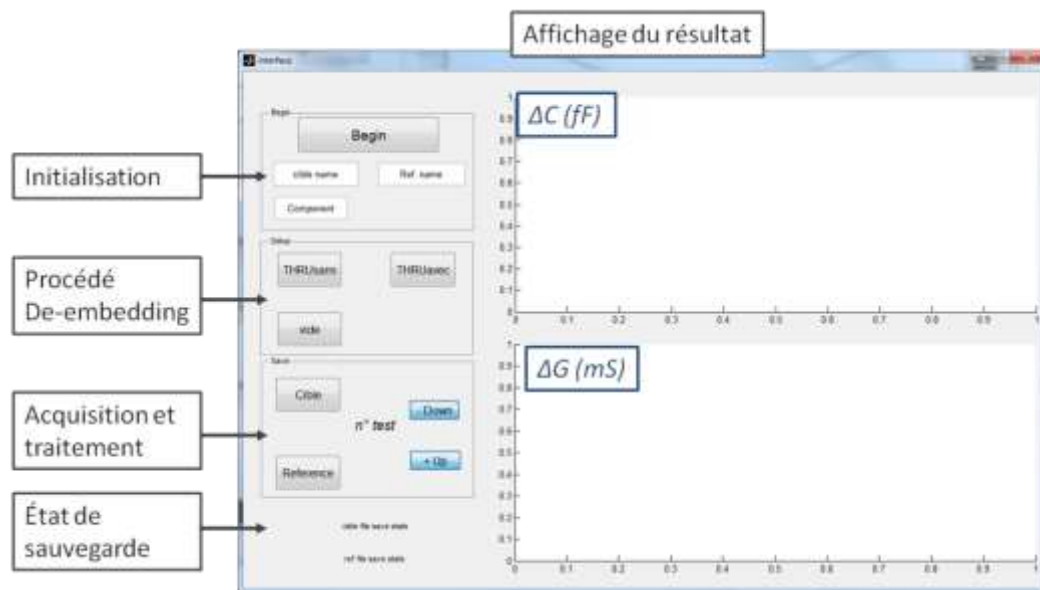


Figure II. 9 Fonctions d'acquisition de l'interface homme-machine

Affichage du résultat : Le résultat du traitement (contrastes diélectriques ΔC et ΔG) est affiché sur les deux fenêtres à droite de l'interface. Sur la Figure II. 10, un exemple montre : les spectres de sept mesures de mélange éthanol - eau (50% - 50%) et une mesure de mélange éthanol-eau (40% - 60%), toutes ces mesures étaient référencées par rapport à de l'eau DI (le niveau 'zéro'). La visualisation des résultats nous permet également de prendre en compte les mesures erronées puis les exclure lors du post-traitement, elle est importante surtout pour les mesures de cellules uniques, qui sont souvent 'bruitées' par la présence des débris biologiques.

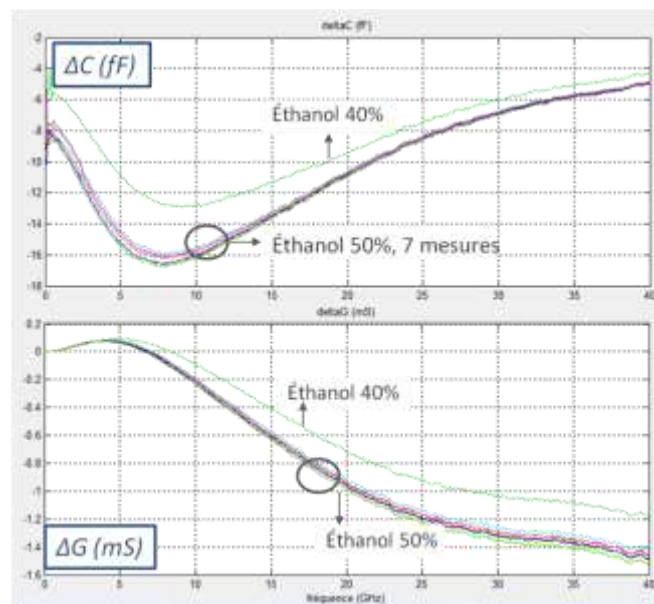


Figure II. 10 Exemple d'affichage des spectres de mesures en temps réel : sept mesures et une mesure de l'éthanol à 50% et à 40% respectivement

II.2 Validation

Afin de valider l'interface HM, nous avons mesuré des mélanges binaires éthanol-eau de différentes concentrations volumiques. Ces sont composés connus, et leurs permittivités sont très différentes l'une à l'autre quelle que soit la fréquence. Deux séries de mesures sont effectuées. Pour la première série, l'éthanol pur est dilué de 90%, 70%, 50%, 40%, 20% et 10% dans de l'eau DI. Ensuite, cette dernière concentration de 10% est diluée en successivement par 2 jusqu'à 0,078%. Toutes les mesures sont effectuées avec le même biocapteur, dans un environnement ambiant à 23°C. Chaque concentration est mesurée au moins 6 fois.

Le résultat du post-traitement des deux séries de mélanges éthanol/eau est montré à la Figure II. 11 et la Figure II. 12. Les spectres présentent les valeurs moyennes des mesures effectuées à chaque concentration. Les contrastes capacitif (ΔC) et conductif (ΔG) sont tracés en fonction de la fréquence jusqu'à 40 GHz, et le niveau zéro présente la référence, qui est pour ce cas de l'eau DI.

Nous pouvons voir que plus la concentration de l'éthanol dans l'eau est faible, plus les contrastes capacitif et conductif sont faibles, et tendent vers le niveau zéro. Le comportement du contraste capacitif montre que :

- pour l'éthanol pur 100%, ΔC maximal est à 4 GHz et vaut -27 fF,
- pour 10% d'éthanol, ΔC maximal est à 12 GHz et vaut -4,5 fF,
- pour 0,078% d'éthanol, ΔC maximal est à 18 GHz et vaut -0,28 fF.

Pour le comportement du contraste conductif (ΔG), nous pouvons observer que le mélange éthanol/eau a un contraste positif aux voisinages de 5-10 GHz. Ce résultat peut être expliqué par le fait que le maximum d'absorption pour l'éthanol se situe aux alentours de 5 à 10 GHz et vaut 15 à 20 GHz pour l'eau. Il est donc normal que l'éthanol (et même des mélanges d'éthanol/eau) présente plus de perte (donc un $\Delta G > 0$) que l'eau pure. Pour toutes les concentrations d'éthanol, le contraste maximal est atteint à 40 GHz : -2,05 mS pour éthanol pur et -0,04 mS pour éthanol 0,078%.

Cette série de mesures valide le bon fonctionnement de l'interface HM. De plus le résultat démontre que des très faibles traces d'éthanol (0,078%) peuvent être détectées par le biocapteur. Cette forte sensibilité est favorable pour les mesures HF des cellules uniques directement dans leur milieu de culture. La cellule est majoritairement composée d'eau, comme son milieu de culture, leurs permittivités sont proches d'une à l'autre.

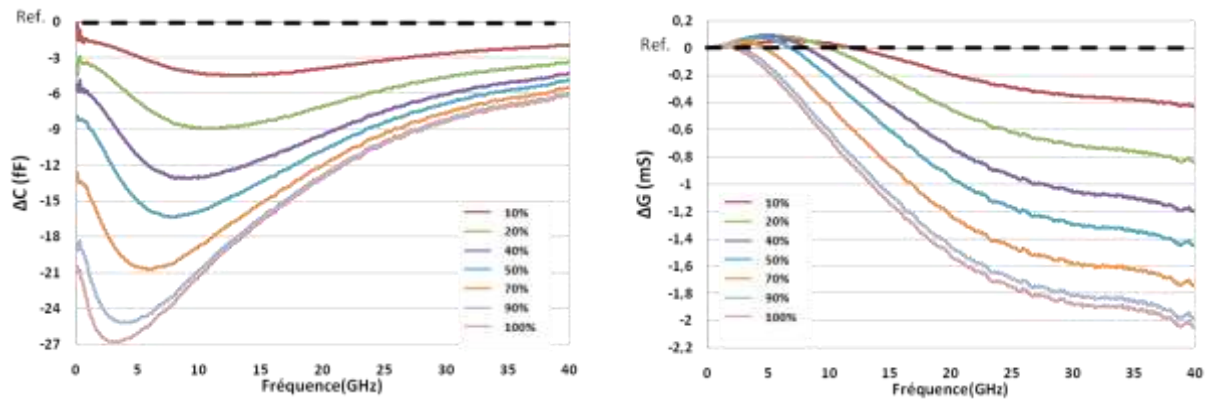


Figure II. 11 Spectres des contrastes capacitif et conductif des mesures de mélange éthanol/eau : 100% - 10 %

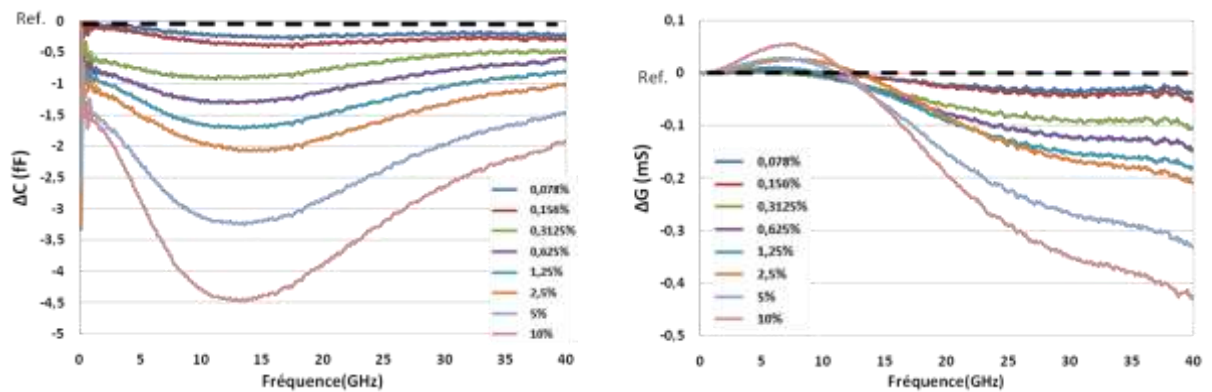


Figure II. 12 Spectres des contrastes capacitif et conductif des mesures de mélange éthanol/eau : 10 % - 0,078 %

III Optimisation de la fabrication des microcanaux fluidiques

Ce paragraphe présente l'optimisation technologique réalisée pour fabriquer les biocapteurs à cellule unique. Afin de pouvoir réaliser un grand nombre de composants, l'utilisation de techniques de fabrication collective est privilégiée. Cela permet de réaliser environ 160 biocapteurs sur une plaquette de 4" de diamètre. Les circuits HF sont fabriqués collectivement sur le substrat en quartz par la technique de "lift-off". Dans ce contexte, la fabrication des microcanaux fluidiques est un enjeu majeur dans la réalisation du biocapteur. Leur élaboration revêt certains points cruciaux:

- le matériau des microcanaux doit être transparent et biocompatible,
- il faut une bonne adhésion des microcanaux au substrat en quartz et au circuit métallique afin d'éviter des fuites,
- une fabrication des microcanaux collective est à privilégier afin de diminuer le coût de production et augmenter le rendement,
- enfin un alignement précis des pièges mécaniques par rapport aux coupures capacitives de circuit HF est nécessaire afin d'obtenir la meilleure sensibilité et reproductibilité des résultats de mesure.

Dans cette section, les procédés dédiés à la fabrication des microcanaux sont présentés et comparés, à travers les différents matériaux employés, tout en mettant en lumière la nouvelle technologie que nous avons développée.

III.1 Canaux microfluidiques réalisés à partir du matériau PDMS

De nos jours, la majorité des dispositifs microfluidiques développés utilisent le Polydimethylsiloxane (PDMS). Le PDMS est un élastomère transparent, biocompatible, déformable, facile à mouler et peu cher. La simplicité d'usage et la facilité à établir des protocoles de fabrication contrôlés font que le PDMS est très présent dans le domaine de la microfluidique [6].

Les canaux microfluidiques sont fabriqués par moulage. Le procédé comprend les étapes suivantes :

- la fabrication du moule microfluidique par photolithographie,
- le moulage du PDMS liquide et sa réticulation,
- le démoulage, découpage, puis perçage pour réaliser les accès fluidiques,
- l'assemblage et collage du bloc de PDMS avec le microcanal et le piège mécanique sur le circuit HF pour assembler le biocapteur (Figure II. 13) après un traitement de la surface au plasma O_2 .

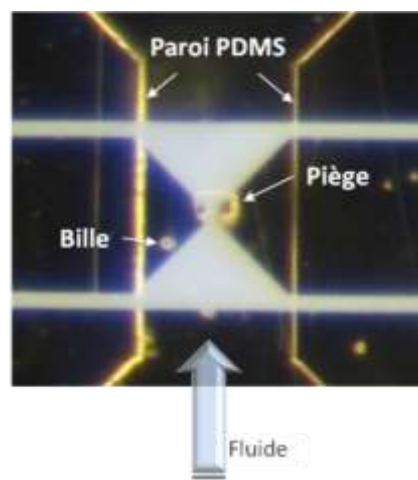


Figure II. 13 Photographie du biocapteur micro-onde à cellule unique avec canal et piège en PDMS

Bien que l'avantage du canal réalisé en PDMS réside dans sa simplicité de mise en œuvre, cette technologie présente un inconvénient majeur : le découpage individuel du microcanal, l'alignement manuel du microcanal sur le circuit HF. Ces opérations sont extrêmement chronophages et peu efficaces, elles sont la cause du défaut de reproductibilité et de répétabilité des biocapteurs. De plus, le PDMS étant un élastomère assez flexible même recuit, la mise sous pression des canaux ou lors du collage des canaux sur le circuit HF peut amener le bloqueur à se coller sur le substrat en quartz, ce qui rend la structure non fonctionnelle. Nous nous sommes donc intéressés à l'utilisation de matériaux compatibles avec une fabrication collective.

III.2 Canaux microfluidiques réalisés à partir de matériaux photosensibles

Notre solution s'est portée sur l'utilisation des matériaux photosensibles. Ils permettent de fabriquer les microcanaux directement sur le substrat et les circuits HF, de manière collective. Le procédé de fabrication utilise des machines d'alignement qui assurent une excellente précision d'alignement.

Les deux principaux procédés employés pour la fabrication des microcanaux sont:

Photolithographie : c'est un procédé de microtechnologie. Elle consiste à structurer une résine selon un motif dessiné et reporté sur un masque. La résine est donc déposée, pré-recuite, insolée à travers un masque avec un faisceau optique localisé dans la gamme des UVs, suivi d'un nouveau recuit dit PEB (Post Exposure Bake en anglais) puis développée. Pour une résine positive, la partie insolée deviendra soluble au révélateur lors du développement et la partie non insolée restera. Au cas contraire, pour une résine négative, la partie non insolée sera soluble et la partie insolée restera.

Laminage : c'est une technologie de report de couches. Il permet de laminier et structurer les couches. Les films photosensibles peuvent être fabriqués (à partir de résine liquide) ou achetés directement. Les précédents travaux de thèse [7], [8] et [1] ont permis de mettre au point la technique de laminage et la réalisation de films secs photosensibles à partir de la résine SU-8. La fabrication de film sec consiste à enduire la résine sur un film souple en PET qui est lui-même adhérent sur un substrat dur, de procéder à un pré-recuit et de retirer cette couche flexible. Le procédé de laminage consiste ensuite à laminier le film sec sur une surface d'intérêt par pression et à une température définie. Souvent, une étape de photolithographie suit.

III.2.1 Le polymère SU-8

Le matériau SU-8 est une résine négative. Il est également l'un des matériaux les plus biocompatibles connus, et souvent utilisé dans la réalisation de BioMEMS [9]-[11].

Le procédé de fabrication comprend deux parties : (A) la réalisation des murs des canaux et des pièges, et (B) le capotage des canaux. Les étapes de chaque partie sont décrites ci-dessous et illustrées à la Figure II. 14 et la Figure II. 15.

A. Réalisation des murs des canaux et pièges

1. **Couche sacrificielle de 5 μm d'épaisseur**: cette étape consiste à réaliser l'espacement entre le substrat et le fond du piège. La couche sacrificielle utilisée est non photosensible, non soluble dans l'acétone et compatible avec les procédés SU-8. Le motif est obtenu par l'utilisation d'une résine photosensible de masquage.

- a) **Dépôt de 5 μm et pré-recuit.**

- b) - d) **Photolithographie de la résine de masquage :**
 - b) - Dépôt pleine plaquette à la tournette. Pré-recuit.
 - c) - Alignement et insolation. PEB.
 - d) - Développement. Le développeur de la résine de masquage sert également à graver chimiquement la couche sacrificielle.
 - e) **Suppression** de la résine de masquage à l'acétone.
2. **Murs et pièges SU-8:** cette étape consiste à fabriquer collectivement les murs et pièges en SU-8 sur le substrat. Les pièges sont alignés précisément juste au-dessus du gap capacitif, à l'aide des machines d'alignement conventionnels. La SU-8 est sensible au choc thermique, ses deux recuits puis refroidissements à la température ambiante se font donc avec des rampes en température. La durée de recuit dépend de l'épaisseur de SU-8, environ 30min dans notre cas, pour une épaisseur de 50 μm .
- a) **Dépôt SU-8 50 μm** : pleine plaquette à la tournette. Pré-recuit.
 - b) - c) **Photolithographie :**
 - b) - Alignement et insolation. PEB.
 - c) - Développement. La structure ouverte des canaux fluidiques est obtenue.

B. Capotage des canaux

3. **Fabrication du film sec SU-8 :** cette étape consiste à fabriquer le film sec SU-8 non réticulé. Il est ensuite reporté sur la surface d'intérêt par la technique de laminage.
- a) **Laminage** couche d'adhésif et film de protection PET.
 - b) **Dépôt SU-8 25 μm** : pleine plaquette à la tournette. Pré-recuit.
 - c) **Pelage du film** : Le film sec obtenu (SU-8 + PET) est retiré du wafer.
4. **Capotage :** cette étape consiste à fermer hermétiquement les structures réalisées à l'étape précédente. La température du laminage est de 65°C, située au-dessus de la température de transition vitreuse de la résine SU-8 non réticulée. Elle permet d'obtenir une surface de collage homogène.
- d) **Laminage** du film sec sur les canaux fluidiques, Pression = 2 bars, T°C = 65°C.
 - e) - f) **Photolithographie :**
 - e) - Alignement et insolation. PEB.
 - f) - Développement. Puis un recuit final qui permet de stabiliser la SU-8. Le piège tient au capot du canal.
 - g) **Suppression de la couche sacrificielle** par gravure chimique.

Le procédé basé sur la technologie SU-8 a été mis au point précédemment [1] et appliqué avec succès. Les canaux et pièges sont correctement élaborés. Les pièges sont bien définis et alignés de manière satisfaisante (erreur d'alignement 1 - 2 μm). Cependant, la SU-8 est relativement chère (> 2000 €/L) et chronophage du point de

vue de sa mise en œuvre. De plus, la couche de SU-8 non réticulée du film sec est fragile et la partie du contour est souvent cassée lors du pelage. La planéité de la surface n'est pas parfaite, ce qui fait que le collage du piège avec le capot est parfois mal pris. Il peut causer éventuellement des fuites ou le décollage du capot. Nous nous sommes donc intéressés à un autre matériau.

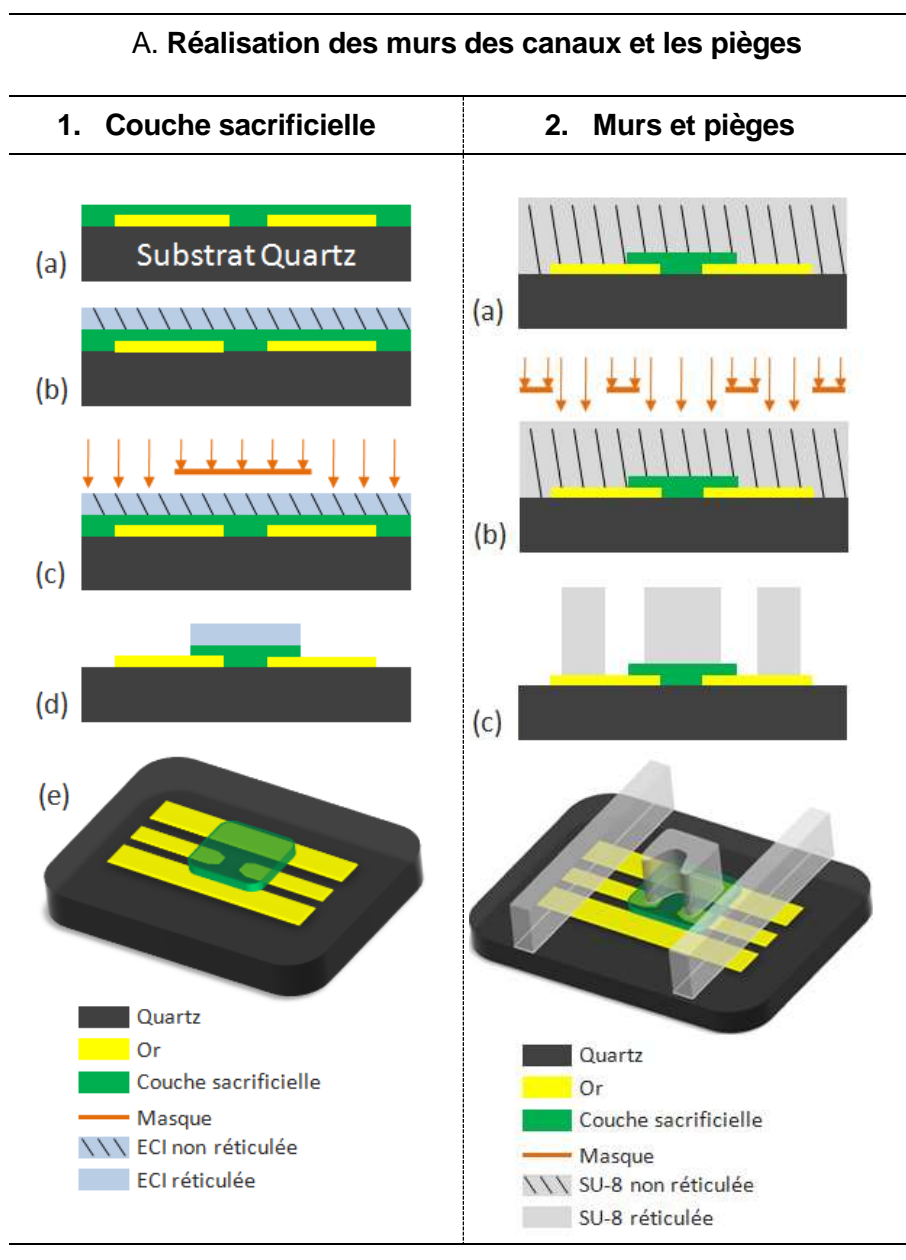


Figure II. 14 Procédés de fabrication en technologie SU-8 : (a) Réalisation des murs des canaux et les pièges

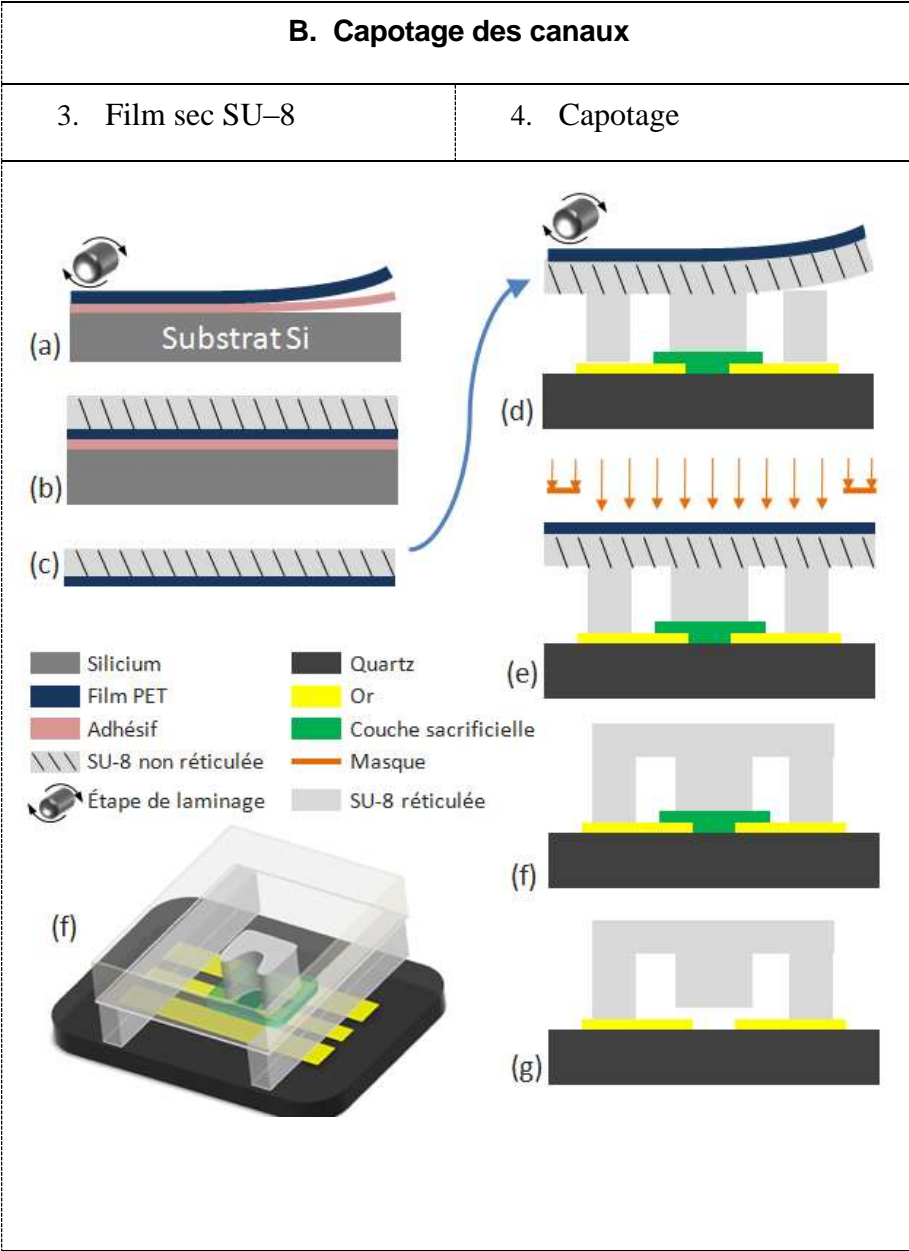


Figure II. 15 Procédés de fabrication en technologie SU-8 : (b) Capotage des canaux

III.2.2 Film sec - Dry Film (DF)

Les travaux effectués [12] au sein du laboratoire permettent d'affronter les limites dues à l'utilisation de SU-8. L'approche consiste à utiliser un film sec photosensible commercialisé. Elle est présentée comme une alternative intéressante à moindre coût et le temps de préparation du film est "économisé".

La solution porte sur le film sec DF-1000 série de la société *Engineered Material Systems*, Inc. (EMS). Le DF est basé sur une résine négative dont les propriétés sont très proches de la SU-8, et disponible en différentes épaisseurs (5 à 50 μm). Le DF est un matériau à bas coût, avec un prix d'environ 1/14 et sa mise en œuvre est trois fois plus rapide que pour la SU-8. Des tests de biocompatibilité du DF ont révélé que ce film est également utilisable pour des études à caractère biologique (cellulaire, bactériologique...).

Le procédé de fabrication développé pour nos biocapteurs micro-onde à cellule unique est illustré à la Figure II. 16 et indiqué ci-dessous.

A. Réalisation des murs des canaux et les pièges

1. **Couche sacrificielle 5 μm :** cette étape est identique à celle du procédé SU-8.
2. **Murs et pièges:** Le film DF est prêt à être employé et ne nécessite pas de pré-recuit. Il peut être reporté directement sur la surface d'intérêt, suivi d'une étape de photolithographie. Pour ce premier niveau, le PEB se fait directement à la température désirée, sans nécessité de rampe en température ni de refroidissement pour revenir à la température ambiante. La durée du recuit est d'ordre de 10 min, contre 30 min pour la SU-8.
 - a) **Laminage DF 50 μm .** Le film de protection PET est retiré après le laminage.
 - b) - c) **Photolithographie :**
 - b) - Alignement et insolation. PEB.
 - c) - Développement.

B. Capotage des canaux

3. **Capotage :** cette étape consiste à reporter un niveau supérieur de DF sur les structures réalisées à l'étape précédente.
 - d) **Laminage DF 50 μm .**
 - e) **Photolithographie :** Alignement et insolation. PEB. Développement. Et un recuit final qui permet de stabiliser la résine de DF. Le piège se tient au capot du canal.
 - f) **Suppression de la couche sacrificielle** par gravure chimique.

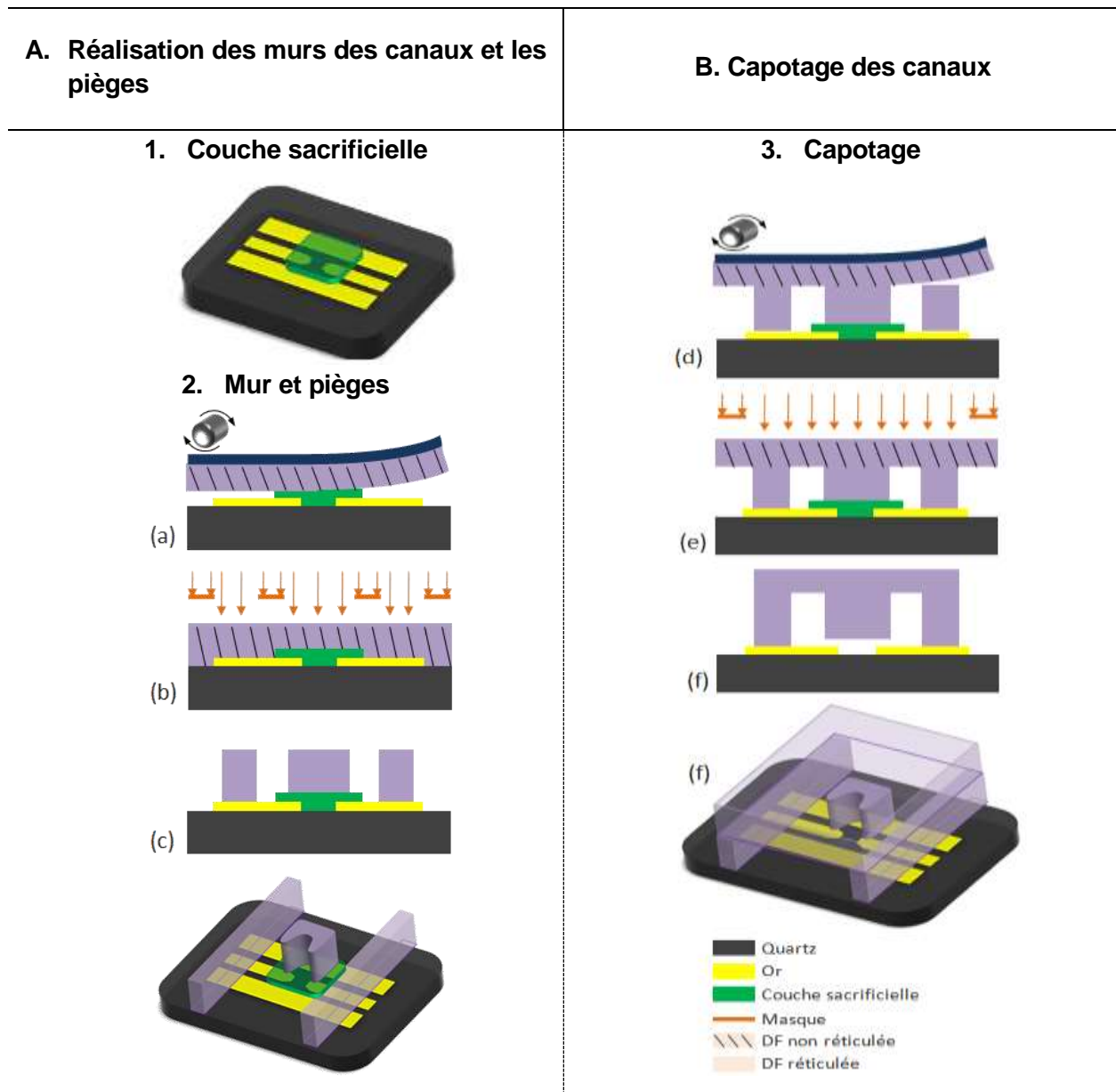


Figure II. 16 Procédé de fabrication en technologie DF-1000

Pour conclure, l'utilisation de la SU-8 permet d'obtenir des composants fonctionnels, mais le procédé est long, coûteux et de rendement moindre. L'utilisation de films DF a montré un grand intérêt à moindres coût et temps de procédé :

- Coût de fabrication d'une couche moins cher : 46 € contre plus de 110 € en SU-8.
- Durée de procès pour la structuration d'une couche plus courte : 30 min contre env. 1h40 en SU-8.
- Rendement final amélioré : >95% contre environ 80% en SU-8.

Les pièges sont bien définis et le collage du canal avec le capot est bien obtenu. Ces éléments sont montrés sur la Figure II. 17 avec des photographies prises avec un MEB pour les structures réalisées à base de DF. Pour les structures réalisées avec de

la SU-8, nous ne sommes pas à même de montrer de photographies en raison de la fragilité et l'aspect cassant du film SU8. Sa découpe n'a pas pu être obtenue.

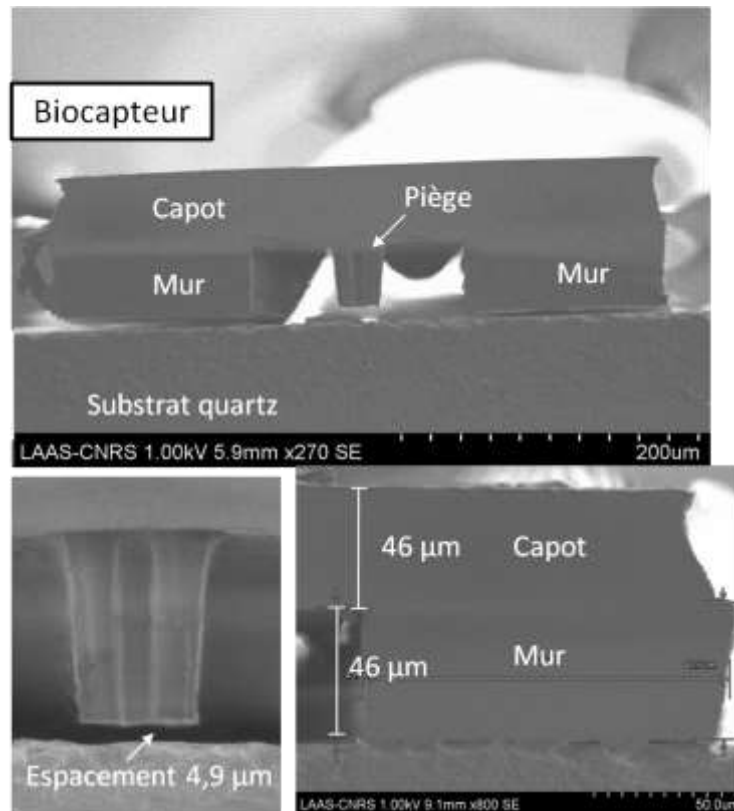


Figure II. 17 Images MEB de la vue en coupe d'un biocapteur réalisé en DF et découpé

Grâce aux technologies développées, nous nous sommes alors intéressé à l'efficacité de piégeage des structures fabriquées avec comme premier modèle des billes de polystyrène puis des cellules dans leur milieu de culture.

IV Optimisation de l'efficacité de piégeage

Les différentes techniques de manipulation cellulaire ont été présentées dans le chapitre I. La méthode employant la force hydrodynamique est particulièrement intéressante pour son efficacité de manipulation et sa simplification à l'intégration à notre biocapteur. C'est donc cette technique de blocage de cellules qui avait été choisie lors de travaux initiaux [1] et qui a été caractérisée et optimisée lors de nos travaux.

Un compromis existe entre l'efficacité de chargement de la particule unique et la conception de la géométrie du piège. Dans cette section, une étude de l'efficacité du piégeage et la libération des particules uniques du biocapteur est démontrée, à travers trois différentes configurations de pièges mécaniques. Trois critères ont été évalués simultanément, tels que le temps de blocage, le nombre de piégeages consécutifs et la capacité de libération des particules uniques piégées. Les simulations du flux

hydrodynamique dans le canal et au voisinage du bloqueur ont également été effectuées à l'aide du logiciel COMSOL® Multiphysics.

IV.1 Description des trois configurations de pièges mécaniques

Les trois configurations de pièges développées et évaluées sont basées sur les travaux de Dino Di Carlo [13]. Les géométries physiques de la structure du piège, avec une face concave, sont conçues pour piéger seulement une seule cellule. Les trois modèles de pièges ont la même dimension globale et diffèrent par la géométrie de la zone de fuite de liquide. Ils se distinguent en effet par la taille de leur espacement qui permet de laisser passer une fraction de fluide et dirige la cellule arrivant face au piège vers celui-ci. Les trois modèles de pièges sont présentés sur la Figure II. 18.

- **Piège Pont**, il est composé de deux piliers latéraux au gap capacitif, impliquant un espacement (largeur de $5\ \mu\text{m}$ et hauteur de $5\ \mu\text{m}$) en son centre.
- **Piège Flotteur**, il est flottant avec un passage (hauteur de $5\ \mu\text{m}$) possible de liquide sous toute sa surface basse, entre son fond et le substrat. Ce piège est maintenu en place grâce à son collage avec le capot du canal fluidique.
- **Piège Canyon**, il est constitué d'un passage fendu (dit 'canyon') en son centre, sur toute la hauteur du canal fluidique. Il est attaché à la fois au substrat et au capot fluidique.

Les pièges pont et flotteur présente un espacement d'une hauteur de $5\ \mu\text{m}$, dimension inférieure à la taille des cellules.

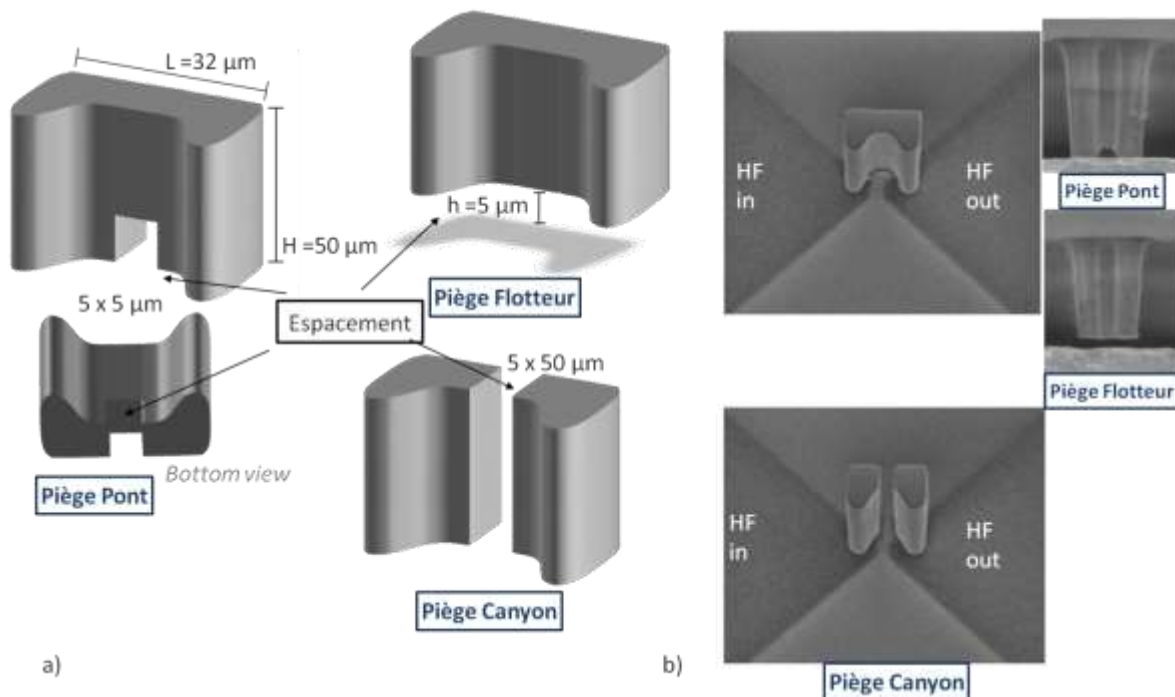


Figure II. 18 (a) Images 3D et (b) Images MEB des trois modèles de pièges mécaniques

IV.2 Étude de l'efficacité de piégeage de particules et de cellules

Nous avons effectué cette étude afin de déterminer le modèle de piège à employer. Pour cela, nous avons utilisé comme premiers éléments de test des billes de polystyrène puis des cellules dans leur milieu de culture. Nous avons injecté des gouttes de suspensions de particules dans le canal fluide, puis nous observons chaque type de piège suivant trois critères:

- le temps de blocage d'une particule, la particule piégée est observée à la fois électriquement (contrastes diélectriques significatifs obtenus) et visuellement (vu sur l'écran LCD du banc de caractérisation),
- la possibilité de libération de la particule piégée,
- le nombre de piégeages consécutifs avec un même biocapteur, pour une durée de mesure de 10 min.

Conditions de mesure – les mesures sont effectuées dans les mêmes conditions. Nous avons effectué des tests afin de définir la concentration de particules et la vitesse du flux optimales. Nous avons trouvé que plus la concentration ou la vitesse du flux est faible, plus les particules sont difficiles à piéger. De plus, si la concentration est élevée, plusieurs particules sont piégées. Nous avons donc décidé de choisir les conditions de mesure suivantes :

- **concentration de particules à 1 million particules/ml.** Le protocole de préparation de la solution est présenté dans le chapitre III. Nous avons utilisé deux solutions :
 - **Microsphères de polystyrène** (Polysciences, Inc., Polybead®) : elles ont un diamètre de 10 μm , et sont en suspension aqueuse avec une concentration de 45,4 millions particules/ml. Les microsphères ont ensuite été suspendues dans l'eau DI à une concentration de 1 million/ml.
 - **Cellules de la lignée THP1⁷** : elles ont un diamètre moyen de 15 μm , elles sont en suspension dans leur milieu de culture (RPMI + 10% SVF), comme montré dans la Figure II. 19,

⁷THP-1 (ATCC® TIB202™) est une lignée cellulaire de monocytes humains provenant d'un patient atteint de leucémie aiguë monocyttaire.

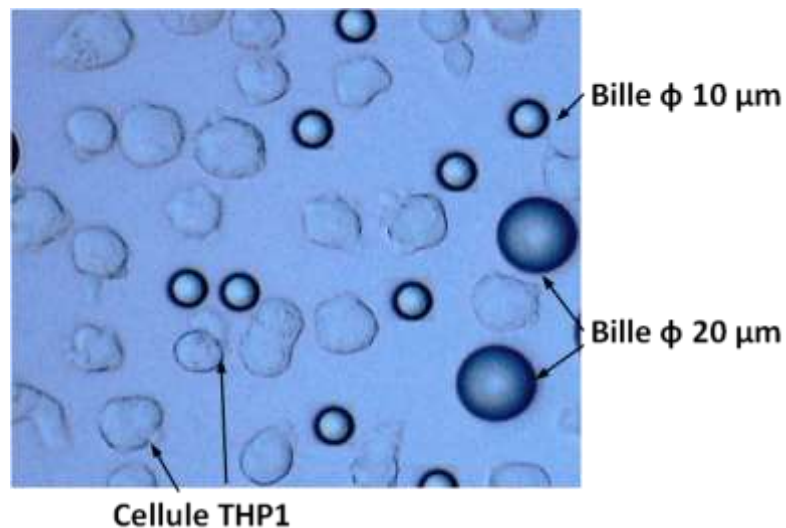


Figure II. 19 Photographie de cellules THP1 et de billes en polystyrène de diamètres 10 μm et 20 μm

- **la vitesse du flux à 1 mm/s** passant à travers le canal microfluidique. Elle est gérée par un pousse seringue, avec la vitesse du flux près du piège mécanique maintenue constante pendant la manipulation.

Le résultat des tests sur l'efficacité de piégeage est résumé dans le Tableau II. 1.

Tableau II. 1 Récapitulatif des tests sur l'efficacité de piégeage pour les différents types de bloqueur

		Modèle de piège mécanique		
		Pont	Flotteur	Canyon
Temps de chargement d'une particule	visuelle	3-4 min	10 s – 30 s	10 s – 30 s
	électrique	idem	idem	10 s – 3 min
Débloquage de la particule piégée		Non	Oui	Oui
Nbr. de piégeages consécutifs avec un biocapteur (durant une période de 10 minutes)		1 bille	> 5 billes	2 - 6 billes
		1 cellule	> 5 cellules	2 -6 cellules

Nous remarquons que :

- Du point de vue efficacité de blocage, le Piège Pont est le moins efficace : son temps déblocage est très long, et il est difficile de débloquer la particule piégée. Ce type de composant ne peut qu'effectuer une mesure lors d'une

manipulation, ce qui implique un rendement faible. Puis visuellement, le Piège Flotteur et le Piège Canyon ont une efficacité identique.

Pour expliquer ce résultat, nous avons étudié la fraction du fluide passant dans l'espacement de chaque piège. Les simulations ont été effectuées avec le logiciel COMSOL® Multiphysics. Le microcanal considéré présente une hauteur de $40\text{ }\mu\text{m}$ et une largeur de $150\text{ }\mu\text{m}$. L'eau est définie comme liquide pour les simulations. Les amplitudes de la vitesse du fluide suivant l'axe X passant sous l'espacement du piège, à la même hauteur ($Z = 2,5\text{ }\mu\text{m}$) sont présentées sur la Figure II. 20.

La vitesse de fluide maximale dans le gap du Piège Pont est de $56\text{ }\mu\text{m/s}$, soit 20% plus faible que celle des autres pièges qui présente une valeur de vitesse de $70\text{ }\mu\text{m/s}$. Ceci indique une fraction du fluide plus faible, donc moins de force hydrodynamique permettant de diriger les cellules vers le piège.

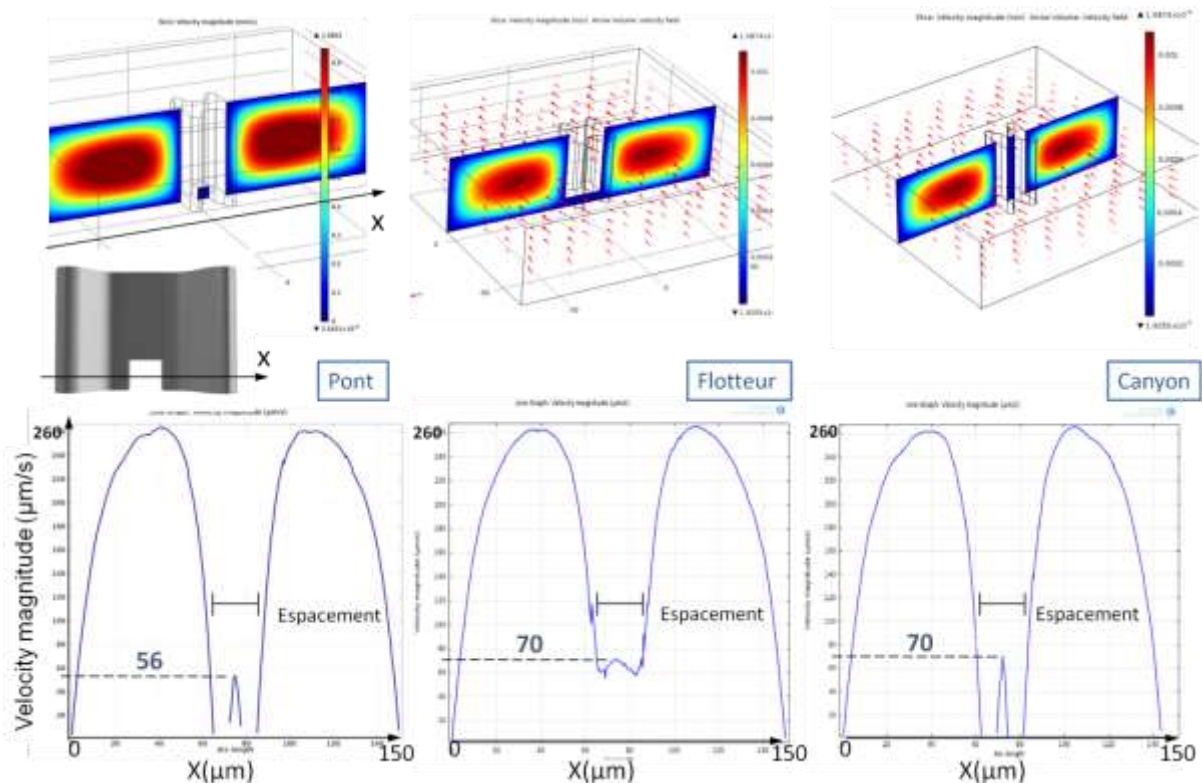


Figure II. 20 Variation de la vitesse de fluide dans l'espacement suivant l'axe X

- Pour un Piège Canyon : les temps de piégeage visuel et électrique sont différents. Souvent, nous avons observé une particule piégée, mais elle n'est pas détectée électriquement. Pour expliquer ce phénomène, nous avons étudié les intensités de la vitesse du fluide suivant l'axe Z de l'espacement, en son centre. Le résultat des simulations est présenté à la Figure II. 21.

Avec le Piège Pont et le Piège Flotteur, la vitesse du fluide maximale est atteinte à la mi-hauteur d'espacement ($Z = 2,5\text{ }\mu\text{m}$). La particule est donc guidée contre le substrat et donc en contact avec le circuit HF, là où les champs électromagnétiques sont les plus intenses. A l'inverse, avec le Piège Canyon, la

vélocité du fluide maximale est atteinte dans la zone 10 – 30 μm au-dessus du substrat. Par conséquent, il est plus susceptible de piéger une particule dans cette partie haute, qui se situe en dehors de la zone de détection HF. Les contrastes ΔC et ΔG de la particule deviennent négligeables.

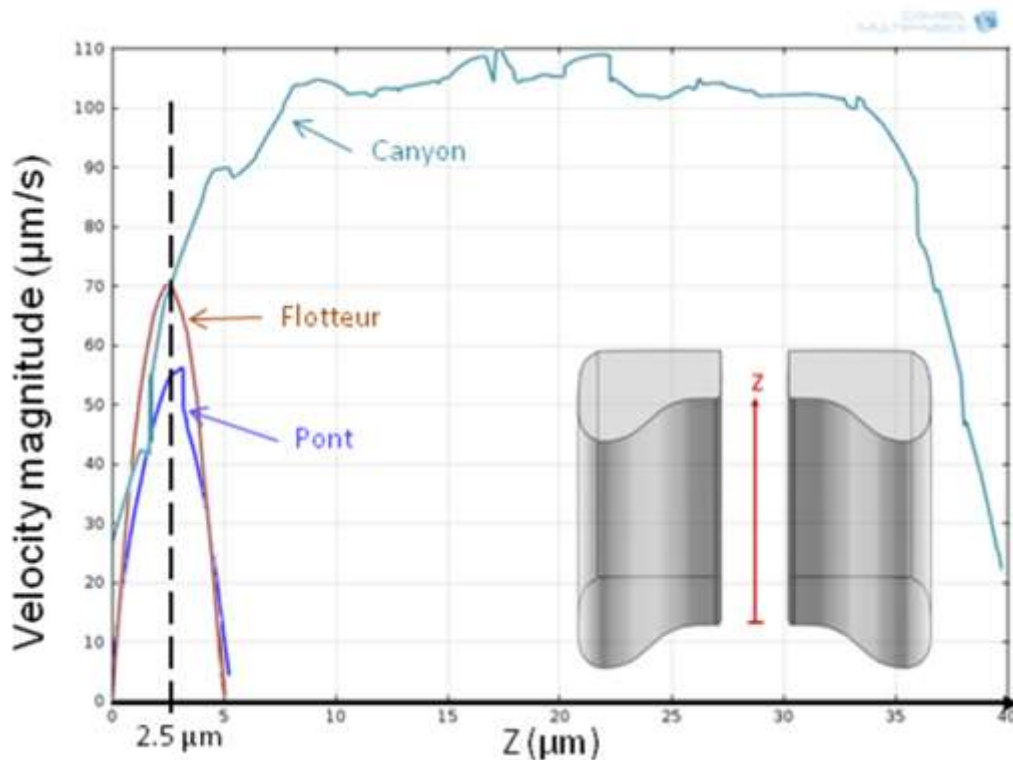


Figure II. 21 La variation de la vitesse de fluide dans l'espace suivant l'axe Z

Pour conclure, basé sur cette étude et afin de maximiser l'efficacité de piégeage du biocapteur, le **Piège Flotteur** est préféré et employé dans la section suivante. Il offre un piégeage rapide et une libération de particules piégées qui permet d'effectuer plusieurs mesures avec un seul biocapteur. A l'inverse, le Piège Canyon ne permet pas d'offrir des mesures répétables, il ne sera plus employé pour la suite. Quant au Piège Pont, il est plus adapté pour le suivi de cellule sur une longue durée puisque le dé-piégeage de cellule est plus difficile.

Cette étude a d'abord été effectuée avec les biocapteurs ayant des microcanaux en SU-8. Une étude identique a également été effectuée avec les biocapteurs ayant des microcanaux en film sec DF. Nous avons obtenu le même résultat.

V Optimisations paramétriques du biocapteur

Dans cette section, des études paramétriques sur la sensibilité des mesures du biocapteur sont présentées. Les différents paramètres évalués sont suivants :

- le diamètre de la particule,
- la permittivité relative de la particule,

- la largeur du gap capacitif du biocapteur,
- l'épaisseur des métallisations constitue le biocapteur.

Pour chaque de ces études, nous avons d'abord effectué des simulations électromagnétiques sur HFSS®, qui ont ensuite été validées par des mesures HF avec des billes de polystyrène dans de l'eau DI.

V.1 Impact du diamètre de la particule

Les cellules THP1 que nous avons analysées ont un diamètre moyen de 15 μm qui est généralement dispersé de 1 à 2 μm . Nous nous sommes donc interrogés sur la sensibilité de notre capteur au diamètre de la particule piégée. Dans cette étude, les simulations avec les billes de diamètres de 10, 15 et 20 μm sont effectuées, et les spectres simulés des contrastes ΔC et ΔG résultant sont présentés à la Figure II. 22.

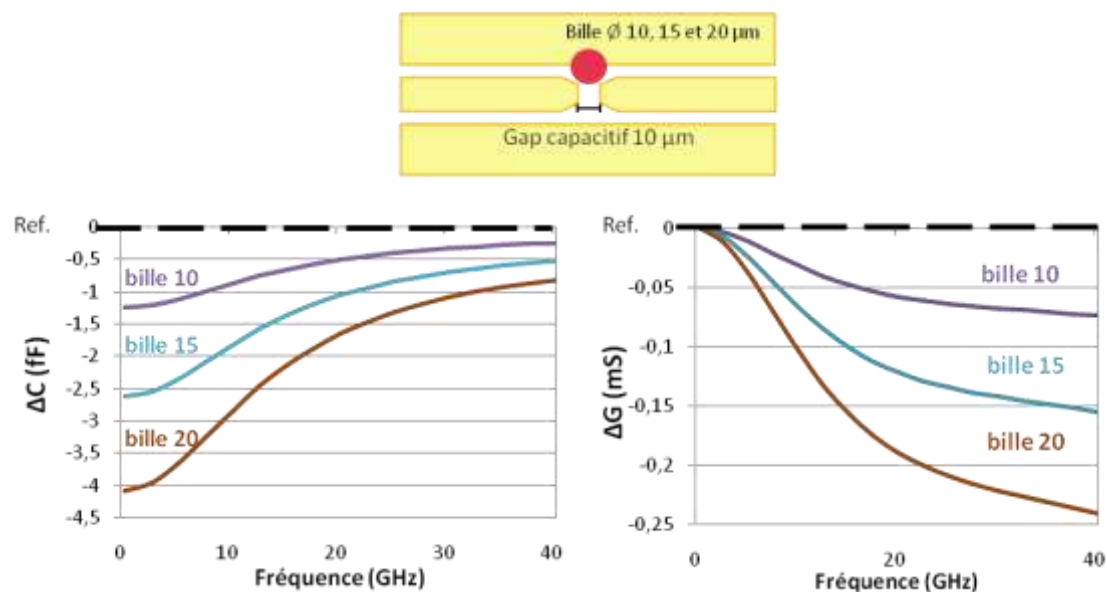


Figure II. 22 Spectres des contrastes ΔC et ΔG simulés d'une bille de diamètre allant de 10, 15 et 20 μm .

Les contrastes ΔC et ΔG augmentent lorsque le diamètre de la bille est plus grand. Comme démontré à la Figure II. 23, les contrastes ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement sont résumés dans un tableau, et nous avons tracé la variation relative des contrastes en fonction de la taille de bille piégée. Nous pouvons observer que :

- cette variation peut être considérée comme linéaire pour les deux contrastes,
- les contrastes ΔC et ΔG varient de -0,254 fF et -0,017 mS respectivement pour une variation d'un μm sur le diamètre de la bille. Ceci correspond à une variation de 10% par rapport aux contrastes d'une bille de diamètre de 15 μm (= diamètre de cellule THP1).

	ΔC (fF) @5GHz	ΔG (mS) @40GHz
Bille 10	-1,12	-0,074
Bille 15	-2,35	-0,155
Bille 20	-3,66	-0,24

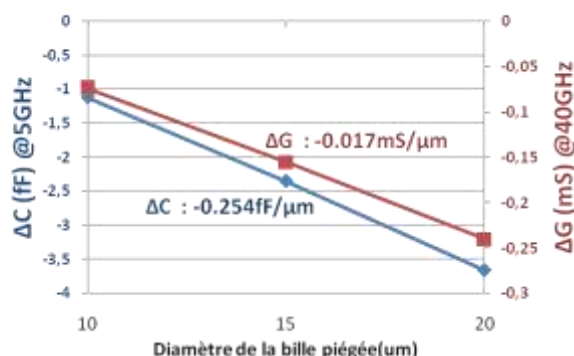


Figure II. 23 (a) tableau des contrastes ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement, (b) les contrastes ΔC et ΔG versus la taille de la bille piégée

Ce résultat peut être expliqué par la variation de l'interaction du champ électromagnétique avec l'intérieur de la bille en fonction de son diamètre, comme le montre la Figure II. 24. Les contours indiquent les différents diamètres des billes simulées. Nous pouvons observer que :

- l'intensité du champ électromagnétique est diminuée de 50% à la hauteur de 10 μm du gap capacitif, celui rejoint l'étude de l'efficacité de piégeage sur le Piège Canyon,
- lorsque le diamètre (plus concrètement, le volume) de la bille augmente, la proportion des matériaux diélectriques en interaction avec le champ électromagnétique augmente également. En conséquence, les ΔC et ΔG deviennent plus importants.

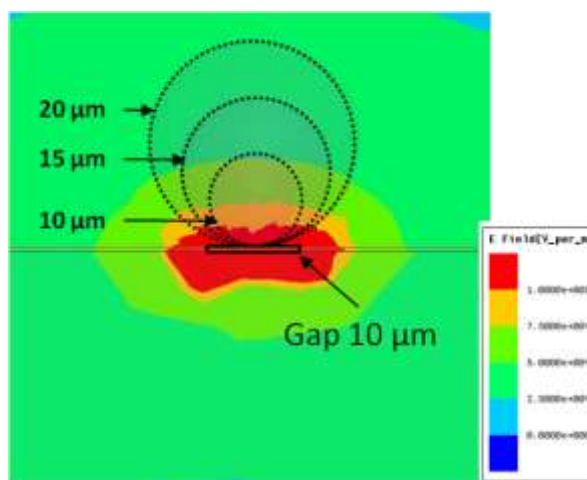


Figure II. 24 Distribution du champ électromagnétique à l'intérieur des billes environnées par de l'eau DI

Afin de valider cette étude en simulation, nous avons mesuré des billes de diamètre 10 et 20 μm dans de l'eau DI. Les mesures sont effectuées avec un biocapteur ayant un Piège Flotteur et un gap capacitif de 10 μm . Pour chaque diamètre, les mesures ont été répétées 6 fois, les spectres ΔC et ΔG moyennés sont présentés à la Figure II. 25.

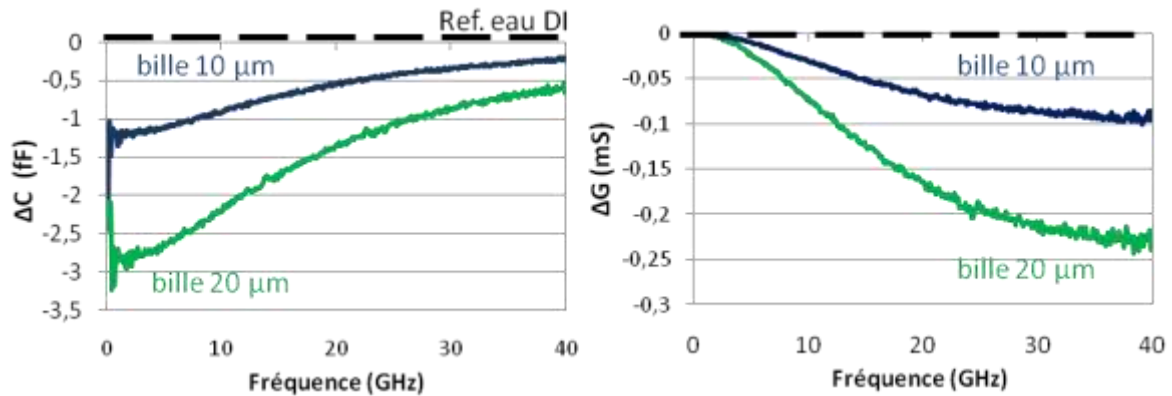


Figure II. 25 Spectres des contrastes ΔC et ΔG mesurées des billes de 10 μm et 20 μm de diamètre dans de l'eau DI

Ce résultat confirme que l'augmentation du diamètre de particule piégée conduit à l'augmentation des contrastes ΔC et ΔG . Le diamètre a donc un impact fort sur les contrastes diélectriques.

V.2 Impact de la permittivité relative de la particule

Le constituant majeur d'une cellule biologique et de son milieu de culture est de l'eau. La permittivité relative de l'eau varie en fonction de la fréquence, et au contraire, celle du polystyrène (les billes) est constante ($= 2,5$). Nous nous sommes donc interrogés sur la sensibilité de notre capteur à la permittivité relative de la particule piégée. Dans cette étude, nous avons effectué les simulations avec une particule de permittivité relative de 2,5, 10 et 20 qui approchent celle de l'eau à 40 GHz [14]. Les simulations sont effectuées avec une bille de 10 μm et un biocapteur ayant un gap capacitif de 10 μm . Les spectres simulés des contrastes ΔC et ΔG résultants sont présentés à la Figure II. 26.

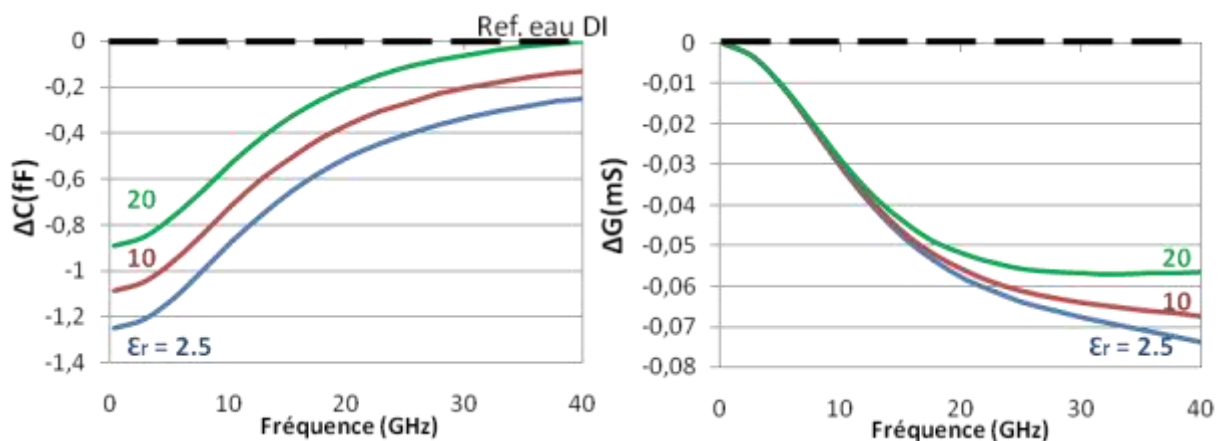


Figure II. 26 Spectres des contrastes ΔC et ΔG simulés pour une particule de permittivité relative allant de 2,5 à 20.

Les contrastes ΔC et ΔG diminuent lorsque la permittivité de la particule augmente. Ceci s'explique par le fait que la valeur de la permittivité de la particule est

de plus en plus approche de celle du milieu hôte (de l'eau DI), les contrastes diélectriques sont donc diminués. Nous avons tracé la variation relative des contrastes en fonction de la permittivité de la particule à la Figure II. 27 (les contrastes ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement sont résumés dans le tableau associé). Nous pouvons observer que les contrastes ΔC et ΔG varient de +0,02 fF et +0,0009 mS respectivement pour une variation de 1 sur la permittivité de la particule. De plus, il est clair à la Figure II. 26 qu'en deçà de 10 GHz seul ΔC est impacté par une variation de la partie réelle de la permittivité de la particule. Notons cependant que cet impact est très faible et pour une particule de $\epsilon = 10$: le ΔC à 5 GHz varie de +2%, et le ΔG à 40 GHz varie de +1,2%.

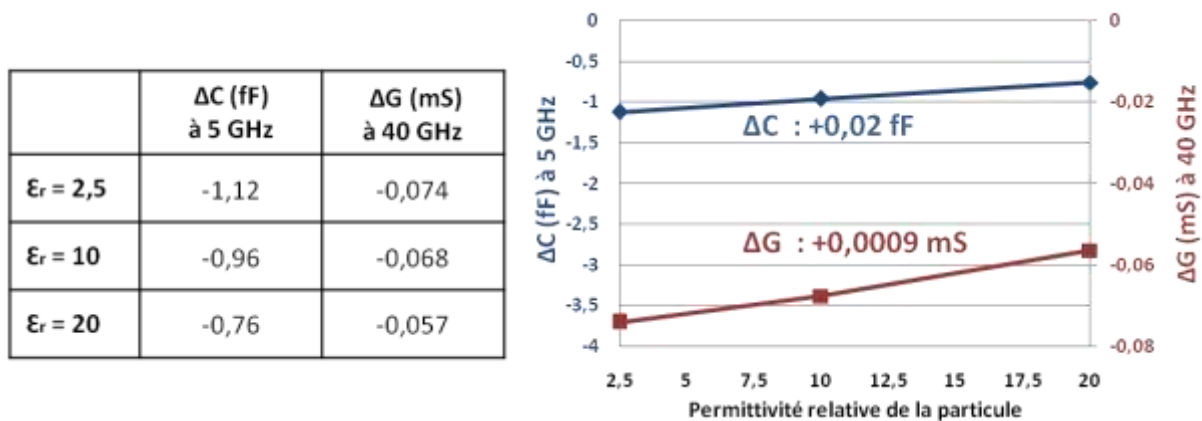


Figure II. 27 Variation relative des contrastes ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement versus la permittivité relative de la particule piégée

L'intérêt de cette étude est de comprendre le comportement des réponses ΔC et ΔG lorsque l'on va passer des billes de polystyrène aux cellules biologiques. Les billes de polystyrène présentent une faible permittivité relative, constante et indépendante de la fréquence, alors que les cellules présentent une permittivité relative élevée et dépendante de la fréquence.

V.3 Impact de la largeur du gap capacitif

Pour les études précédentes, nous avons considéré un biocapteur ayant un gap capacitif de 10 μm . Dans cette étude, deux largeurs : 2 μm et 5 μm du gap capacitif sont étudiées. La diminution du gap capacitif a pour but d'avoir un champ électrique plus focalisé dans la particule piégée. Le diamètre de la bille est de 10 μm pour ces simulations. Les spectres des contrastes ΔC et ΔG résultants sont présentés à la Figure II. 28.

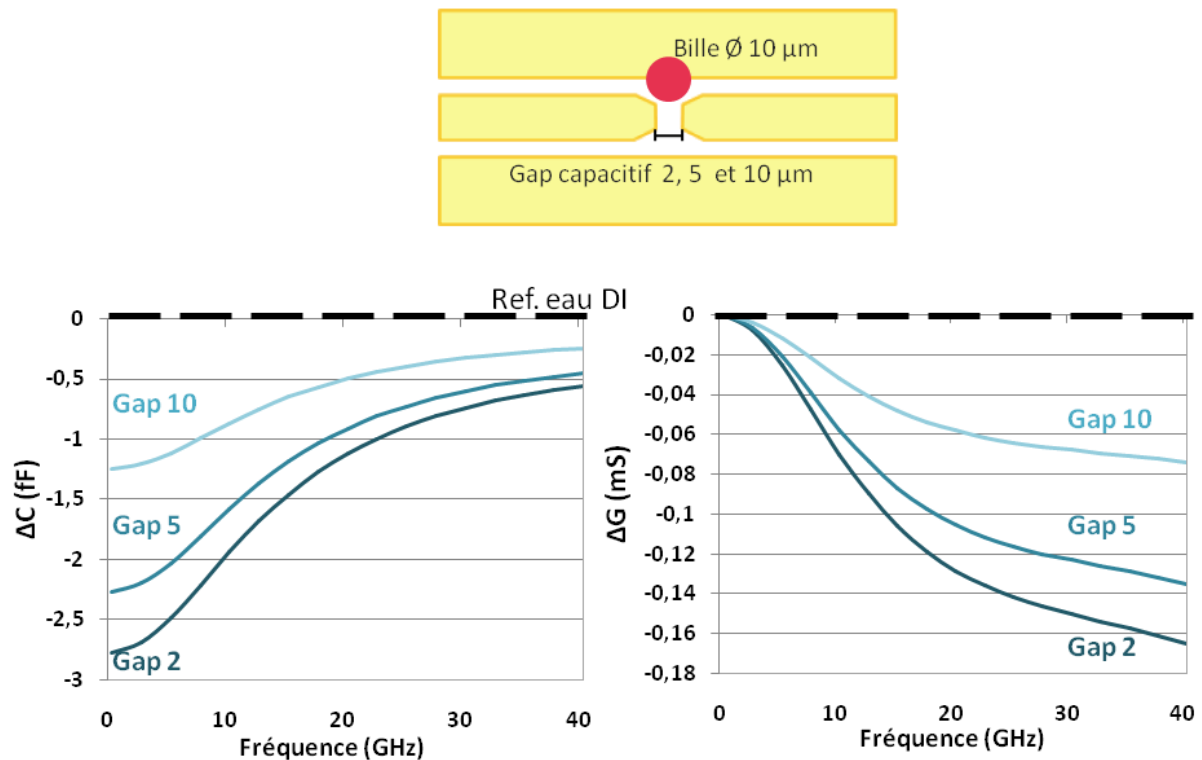


Figure II. 28 Spectres des contrastes ΔC et ΔG simulés pour les largeurs de gap capacitif allant de 2, 5, 10 μm avec une bille de 10 μm de diamètre

Pour les deux contrastes capacitif et conductif, la plus petite largeur du gap capacitif conduit aux plus grands contrastes diélectriques. Nous avons tracé la variation relative des contrastes en fonction de la largeur du gap capacitif à la Figure II. 29 (les contrastes ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement sont résumés dans le tableau associé).

Nous pouvons observer que :

- cette variation peut être considérée comme linéaire pour les deux contrastes,
- les contrastes ΔC et ΔG varient de +0,17 fF et +0,012 mS par variation d'un μm de la largeur du gap capacitif. La largeur du gap capacitif a une influence importante sur les contrastes capacitif et conductif, elle est moins forte que l'impact lié au diamètre de la particule piégée mais plus important que celle de la permittivité relative de la particule.

	ΔC (fF) @5GHz	ΔG (mS) @40GHz
Gap 10 μm	-1,12	-0,074
Gap 5 μm	-2	-0,135
Gap 2 μm	-2,48	--0,165

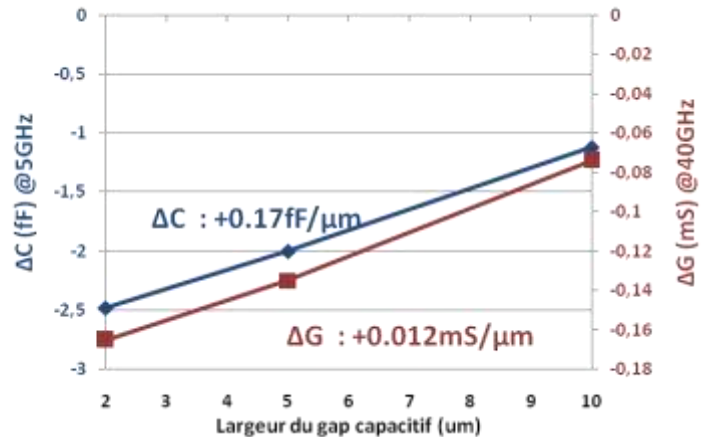


Figure II. 29 Tableau des contrastes ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement (gauche) et les contrastes ΔC et ΔG versus la largeur du gap capacitif (droite)

Pour expliquer ce résultat, nous avons simulé la variation de la pénétration du champ électromagnétique à l'intérieur des billes environnées par de l'eau DI pour chaque largeur du gap capacitif, comme le montre la Figure II. 30. Les contours indiquent les différents diamètres des billes simulées. Les échelles de l'intensité des champs sont les mêmes pour les trois simulations. Nous pouvons observer que :

- la proportion du champ électrique en interaction avec la particule donnée augmente lorsque le gap capacitif diminue. L'intensité du champ à l'intérieur d'une sphère de diamètre de 10 μm est augmentée de 82% et de 63% pour le gap capacitif de 2 μm et 5 μm respectivement, par rapport à celui d'un gap capacitif de 10 μm ,
- par conséquent, le gap capacitif minimal (2 μm) serait préférable pour maximiser la valeur des contrastes diélectriques, soit deux fois plus élevée par rapport au gap 10 μm . Cependant, en raison des contraintes de photolithographie et de coûts de la micro-fabrication, le gap capacitif de 5 μm est favorable et a été employé pour des mesures de particule unique.

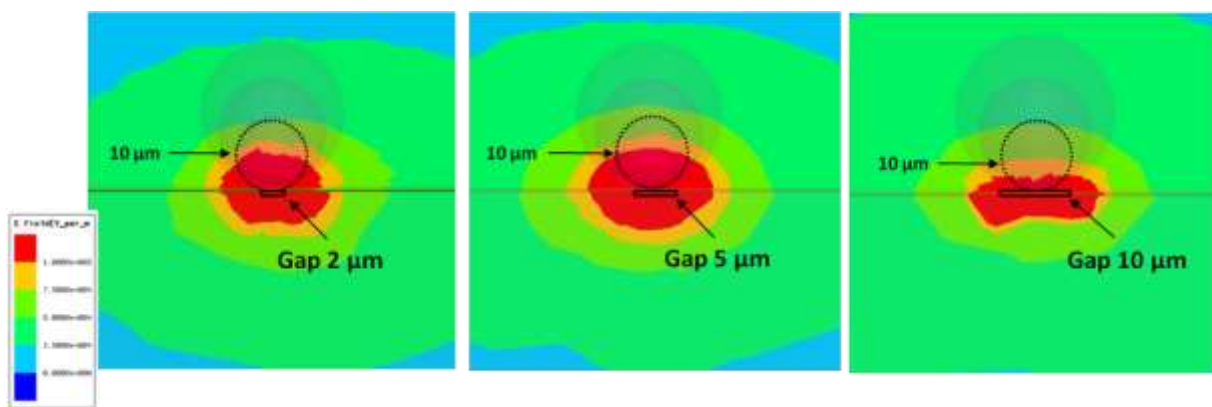


Figure II. 30 Distribution du champ électromagnétique à l'intérieur des billes environnées par de l'eau DI pour gap capacitif allant de 2, 5 et 10 μm

Afin de valider cette étude en simulation, nous avons mesuré des billes de diamètre 10 et 20 μm dans de l'eau DI, avec les biocapteurs muni un Piège Flotteur ayant un gap capacitif de 5 et 10 μm . Pour chaque diamètre, les mesures ont été répétées 6 fois. Les spectres ΔC et ΔG moyennés sont présentés à la Figure II. 31, ainsi que les spectres réalisés avec le gap capacitif de 10 μm .

Pour les deux diamètres de billes, le gap capacitif de 5 μm présente un plus grand contraste par rapport à celui de 10 μm . Les contrastes capacitif et conductif sont respectivement améliorés d'environ 40% et 50%, dans le cas de la bille de diamètre de 10 μm .

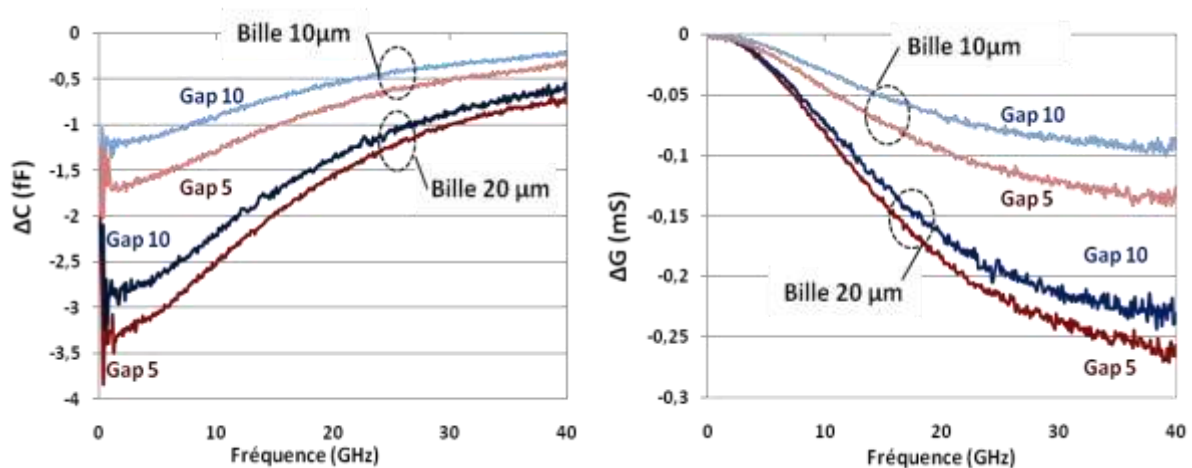


Figure II. 31 Spectres des contrastes ΔC et ΔG mesurées des billes de diamètre 10 et 20 μm dans de l'eau DI, avec les biocapteurs muni un Piège Flotteur ayant un gap capacitif de 5 et 10 μm

V.4 Impact de l'épaisseur de métallisation

La métallisation des circuits HF actuels est composée de titane (500 Å) et d'or (300 nm). Les trois études précédentes ont été réalisées avec des biocapteurs qui présentent une telle épaisseur de métallisation d'or. Basées sur ces études validées, d'autres études de sensibilité du biocapteur sont par conséquent possibles. Dans cette section, l'étude de l'impact de l'épaisseur de métallisation d'or est présentée. Le biocapteur a été stimulé avec des épaisseurs de métallisation d'or allant de 3, 5, 10, 15 et 20 μm . Les billes de polystyrène de diamètre de 10 μm ont été considérées pour les simulations. Les spectres ΔC et ΔG simulés sont présentés à la Figure II. 32.

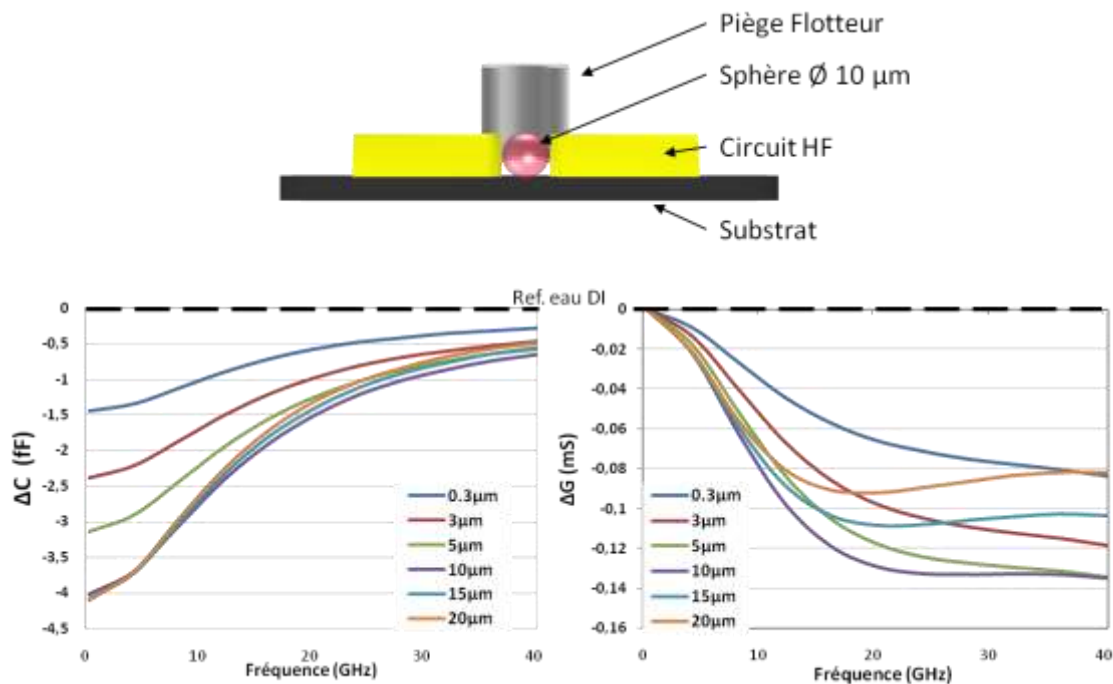


Figure II. 32 Spectres des contrastes ΔC et ΔG d'une bille de polystyrène de diamètre de 10 μm pour les épaisseurs de métallisation d'or comprises entre 0,3 μm et 20 μm

Lors que l'épaisseur de métallisation d'or augmente, nous pouvons observer que :

- les contrastes ΔC augmentent progressivement. Les contrastes diélectriques maximaux à 5 GHz sont atteints pour une épaisseur de 10 μm , comme montré à la Figure II. 32. Par conséquent, les épaisseurs supérieures de 10 μm sont considérées inutiles pour l'amélioration de la sensibilité. Le contraste capacitif peut par conséquent être amélioré d'un facteur 2,4 par rapport à la plus faible épaisseur de métallisation d'or de 0,3 μm . Cela constitue une amélioration majeure de la sensibilité,
- le comportement du contraste ΔG n'est pas aussi clair que celui du contraste capacitif. Il présente une augmentation progressive du contraste (en valeur absolue) suivi d'une stabilisation et d'une diminution. Pour une meilleure visualisation (Figure II. 33), présente ce contraste à 40 GHz par rapport à l'épaisseur de métallisation d'or. Une amélioration du contraste ΔG est d'abord

obtenue pour une métallisation de 5 μm d'épaisseur et sature jusqu'à 10 μm . Le contraste est ainsi amélioré d'un facteur de 1,75. Après cette valeur de seuil, le contraste diminue progressivement jusqu'à atteindre la valeur initiale pour une métallisation de 0,3 μm .

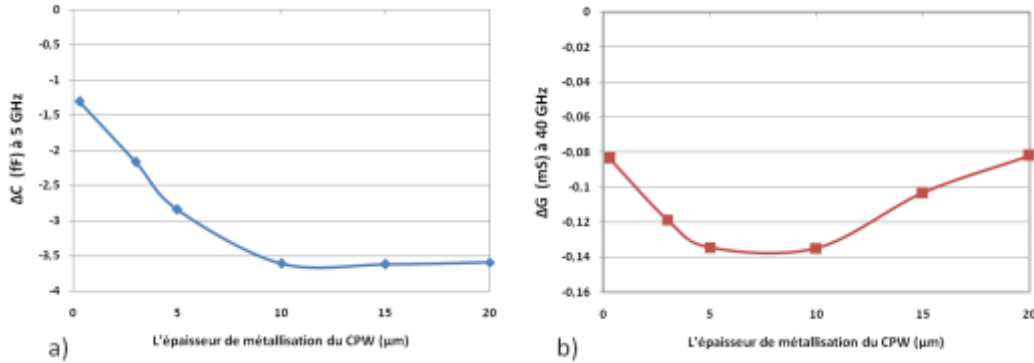


Figure II. 33 Variation des contrastes capacitif (a) et conductif (b) en fonction de l'épaisseur du CPW

Les deux comportements des contrastes capacitif et conductif conduisent par conséquent à la même remarque: les contrastes peuvent être améliorés et optimisés pour une épaisseur de métallisation d'or proche du diamètre de la particule piégée (10 μm dans ce cas).

Pour une meilleure compréhension de ces résultats, les distributions des champs électromagnétiques de tous les cas ont été extraites et sont présentées dans la Figure II. 34. Les contours représentent les billes de polystyrène simulées, leur diamètre est de 10 μm . Les parois de la métallisation en or sont également visibles. Nous pouvons observer une augmentation progressive de l'interaction du champ EM maximal en rouge avec la sphère pour des épaisseurs de métallisation de 0,3 à 10 μm , au-delà l'interaction n'augmentant plus. Par conséquent, l'épaisseur de 10 μm permet de localiser complètement le champ EM dans la sphère de 10 μm diamètre.

Cette étude contribue donc à définir une nouvelle voie de conception et la fabrication d'un biocapteur présentant une sensibilité maximisée.

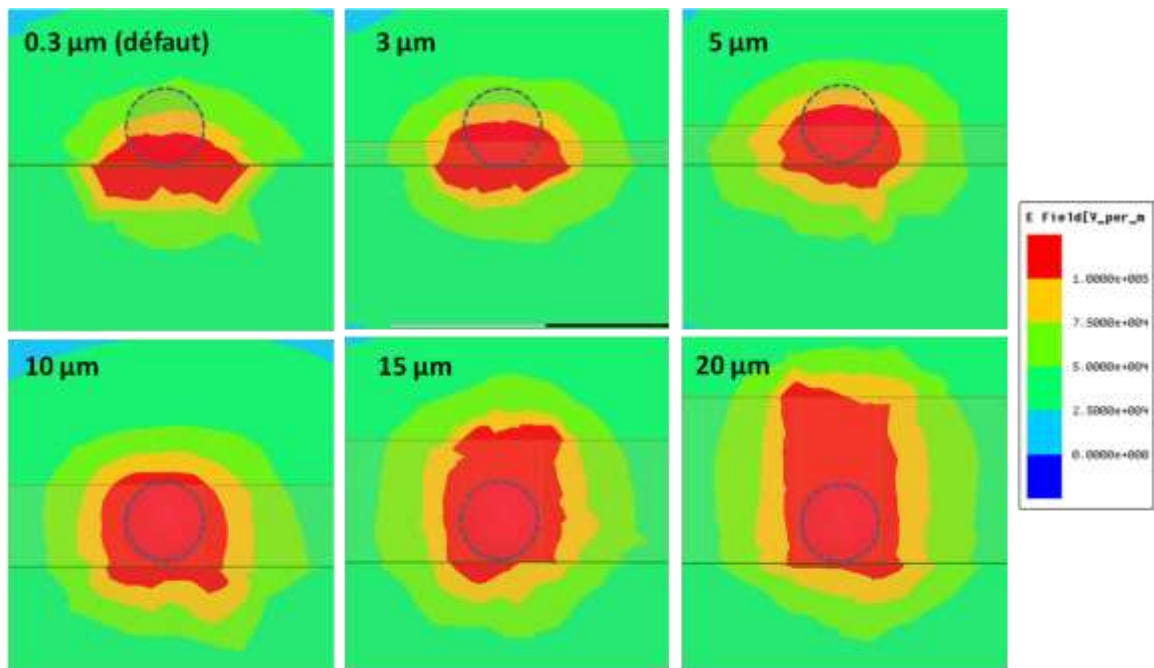


Figure II. 34 Distribution des champs EM dans le biocapteur et la sphère pour différentes épaisseurs de métallisation d'or (pour un diamètre de sphère de 10 μm et un gap capacitif de 10 μm)

VII Conclusions et perspectives

La colonne vertébrale de ce chapitre correspond à l'amélioration de l'efficacité de mise en œuvre du biocapteur à particule (bille ou cellule) unique, incluant les performances du biocapteur et son environnement instrumental.

L'amélioration du banc de test porte sur la mise en place d'une interface HM. L'interface permet de faciliter l'utilisation du banc de test, et augmenter la productivité et le rendement des mesures.

L'amélioration de la fabrication des microcanaux fluidiques porte sur la mise en place d'une nouvelle filière technologique. Cette technologie basée sur l'utilisation de film sec - DF permet la réalisation de canaux fluidiques de manière collective, plus rapide à mettre en œuvre, pour un coût moindre par rapport à la technologie SU-8, avec un meilleur rendement de fabrication.

L'optimisation de l'efficacité du piégeage porte sur l'étude hydrodynamique des 3 modèles de pièges mécaniques. Le résultat issu de cette étude nous permet de choisir un modèle de piège : le Piège Flotteur, qui est efficace en termes d'efficacité et rapidité de piégeage et qui permet aussi la libération de particules/cellules piégées.

Enfin, les optimisations sur la sensibilité de détection du biocapteur portent sur des études paramétriques qui démontrent que:

- le diamètre de la particule piégée a une forte influence, une variation d'un μm de diamètre conduit à une variation de 10% des contrastes capacitif et conductif.
- une variation de la permittivité relative de la particule conduit à une variation des contrastes diélectriques, son influence étant minoritaire.
- la largeur du gap capacitif du circuit HF doit être diminuée afin de focaliser les champs EM dans la particule piégée. En raison des contraintes et coût de fabrication, un gap capacitif de 5 μm a été retenu pour maximiser les contrastes diélectriques de mesures.
- l'augmentation de l'épaisseur en or du circuit HF permet également d'avoir des contrastes diélectriques accrus. Une épaisseur de métallisation d'or proche du diamètre de la particule piégée permet d'obtenir des contrastes env. 200% plus élevés.

De plus, les optimisations du biocapteur en termes d'efficacité de piégeage et de sensibilité ont été validées expérimentalement, avec les billes de polystyrène dans de l'eau DI. Ces études nous permettent de réaliser les campagnes de caractérisation d'une manière plus efficace et plus reproductible. Elles ouvrent également ces perspectives pour la spectroscopie hyperfréquence de cellules biologiques uniques. Les expériences seront présentées au chapitre III suivant.

Bibliographie

- [1] T. Chen, Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasive de la cellule unique : applications en cancérologie, Manuscrit de thèse, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2012.
- [2] W. Barry, "A Broad-Band, Automated, Stripline Technique for the Simultaneous Measurement of Complex Permittivity and Permeability," *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 34, no. 1, pp. 80–84, Jan. 1986.
- [3] B. Kang, J. Cho, C. Cheon, and Y. Kwon, "Nondestructive measurement of complex permittivity and permeability using multilayered coplanar waveguide structures," *IEEE Microw. Wirel. Compon. Lett.*, vol. 15, no. 5, pp. 381–383, May 2005.
- [4] J. C. Booth, N. D. Orloff, J. Mateu, M. Janezic, M. Rinehart, and J. A. Beall, "Quantitative Permittivity Measurements of Nanoliter Liquid Volumes in Microfluidic Channels to 40 GHz," *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, vol. 59, no. 12, pp. 3279–3288, Dec. 2010.
- [5] L. M. Surhone, M. T. Timplendon, and S. F. Marseken, *Skin Effect*. VDM Publishing, 2010.
- [6] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, "Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices," *Acc. Chem. Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 491–499, Jul. 2002.
- [7] R. Fulcrand, "Etude et développement d'une plateforme microfluidique dédiée à des applications biologiques. Intégration d'un actionneur magnétique sur substrat souple," Manuscrit de thèse, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2009.
- [8] P. Abgrall, "Microtechnologies polymères pour les laboratoires sur puces," Manuscrit de thèse, Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2006.
- [9] K. V. Nemani, K. L. Moodie, J. B. Brennick, A. Su, and B. Gimi, "In vitro and in vivo evaluation of SU-8 biocompatibility," *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, vol. 33, no. 7, pp. 4453–4459, Oct. 2013.
- [10] J. Zhang, K. L. Tan, and H. Q. Gong, "Characterization of the polymerization of SU-8 photoresist and its applications in micro-electro-mechanical systems (MEMS)," *Polym. Test.*, vol. 20, no. 6, pp. 693–701, 2001.
- [11] M. Hennemeyer, F. Walther, S. Kerstan, K. Schürzinger, A. M. Gigler, and R. W. Stark, "Cell proliferation assays on plasma activated SU-8," *Microelectron. Eng.*, vol. 85, no. 5–6, pp. 1298–1301, May 2008.
- [12] R. Courson, S. Cargou, V. Conedera, M. Fouet, M. C. Blatche, C. L. Serpentine, and A. M. Gue, "Low-cost multilevel microchannel lab on chip: DF-1000 series dry film photoresist as a promising enabler," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 97, pp. 54847–54853, Oct. 2014.
- [13] D. Di Carlo, N. Aghdam, and L. P. Lee, "Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 14, pp. 4925–4930, Jul. 2006.
- [14] J. Barthel, K. Bachhuber, R. Buchner, H. Hetzenauer, and M. Kleebauer, "A Computer-controlled System of Transmission Lines for the Determination of the Complex Permittivity of Lossy Liquids between 8.5 and 90 GHz," *Berichte Bunsenges. Für Phys. Chem.*, vol. 95, no. 8, pp. 853–859, Aug. 1991.

Chapitre III : Expérimentations statique et dynamique (en temps réel) de cellules uniques

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté nos travaux sur l'optimisation de la micro fabrication, de l'efficacité du piégeage et de la sensibilité des mesures du biocapteur micro-onde à cellule unique. Dans ce dernier cas, certaines études ont été validées avec des mesures de billes de polystyrène individuelles directement dans de l'eau DI.

La micro-fabrication basée sur la technologie film sec DF assure une meilleure répétitivité et répétabilité des biocapteurs réalisés. L'utilisation d'un piège mécanique type 'Flotteur' assure une meilleure efficacité de piégeage et libération de particules uniques. Puis le gap de largeur de 5 μm assure une sensibilité maximale des mesures, soit des contrastes diélectriques (ΔC et ΔG) plus importants.

L'ensemble des études effectuées nous permet de réaliser la spectroscopie diélectrique de cellules uniques vivantes dans leur milieu de culture, dans un premier temps pour des mesures statiques, c'est à dire que l'élément à caractériser est bloqué puis caractérisé diélectriquement à un temps fixe, puis dans le cadre de mesures en temps réel, avec l'élément bloqué et caractérisé sur une période de temps pour évaluer des cinétiques de modifications diélectriques. Dans ce chapitre, nous présentons donc :

- l'étude de la répétitivité et répétabilité des mesures avec des cellules vivantes dans leur milieu de culture,
- la discrimination de cellules vivantes et mortes,
- et le suivi en temps réel de cellules uniques soumise ou non à un stimulus chimique.

I Expérimentations statiques

En ce qui concerne les expérimentations statiques, il s'agit d'étudier les caractéristiques diélectriques du biocapteur avec des matériaux biologiques mesurés après blocage dans le composant et d'en évaluer la répétabilité et répétabilité. Dans un premier temps, nous présentons les mesures de particules uniques (billes de polystyrène et cellules THP1 vivantes), une à une, directement dans un milieu de culture, avec le même biocapteur. Une comparaison des mesures de cellules avec les technologies SU-8 et Film Sec est également montrée. Cette étude a pour but de relever la performance en répétabilité des mesures du biocapteur suivant le matériau étudié : inerte pour les billes de polystyrène ou vivant pour les cellules, avec leur variabilité inhérente. L'étude suivante évalue la répétabilité des mesures du biocapteur. Les mesures de particules uniques (billes de polystyrène et cellules THP1 vivantes) sont effectuées pour des jours de mesures différents, avec des composants différents. Ces résultats nous ont ensuite permis d'aborder et d'effectuer des mesures avec des situations biologiques plus complexes. La différenciation de cellules uniques vivantes et mortes de différentes manières est effectuée dans un second temps.

Condition d'expérimentation : Pour toutes les mesures statiques, une vitesse de flux de 1mm/s (piégeage optimal) est maintenue tout au long de la manipulation. Les biocapteurs ayant une coupure capacitive de 5 μm et un piège mécanique de type Flotteur sont utilisés. Et toutes les solutions sont avec une concentration de 1 million particules/ml. Elle est optimisée pour réussir un piégeage d'une seule particule d'une manière rapide et tout en limitant le volume de consommation.

Processus d'expérimentation:

- injecter la suspension de particules dans le microcanal jusqu'à obtenir le piégeage d'une particule. Puis continuer d'injecter du milieu RPMI seul afin d'éliminer toutes autres particules,
- enregistrer les paramètres S du biocapteur à l'aide de l'interface HM (C et G de la suspension de particule),
- libérer la particule piégée, le piège vidé est chargé uniquement du milieu RPMI,
- Enregistrer les paramètres S du biocapteur à l'aide de l'interface HM (C et G du milieu RPMI, représente la référence – niveau 'zéro' de toutes les mesures)
- visualiser les contrastes ΔC et ΔG : « particule unique dans le milieu RPMI » - « milieu RPMI seul » obtenus,
- répéter n fois les étapes précédentes.

I.1 Étude de répétabilité et répétabilité des mesures

I.1.1 Protocole de préparation des solutions de particules/cellules

Pour nos mesures, nous avons utilisé :

Milieu de culture utilisé pour nos cellules : le milieu de culture est composé du milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (**RPMI**) complété avec 10% de sérum de veau foetal (**SVF**) et 1% d'un cocktail d'antibiotiques. Le RPMI est traditionnellement utilisé pour la culture de cellules humaines circulantes (les cellules THP1 dans notre cas), il contient essentiellement des vitamines mais sans protéines ni lipides. Par conséquent, le RPMI nécessite une supplémentation, en général avec 10% SVF. L'importante variété de protéines dans le SVF maintient les cellules en culture, de les assurer de survivre, grandir et se multiplier.

Billes de polystyrène de diamètre 10µm: les billes sont initialement en suspension aqueuse avec une concentration de 45,5 millions particules/ml. Pour atteindre la concentration souhaitée (de 1 million particules/ml), la solution mère est d'abord diluée 44,5 fois dans du milieu RPMI. Après centrifugation, le surnageant est retiré et remplacé par du milieu RPMI. Le protocole est présenté à la Figure III. 1(a).

Cellules THP1 vivantes: La lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 est obtenue auprès de l'ATCC (LGC Standard, Molsheim, France), elle a été caractérisée en 1980 par S. Tsuchiya [1]. Les cellules THP1 peuvent être brièvement décrites comme cellules singulières avec une large et ronde morphologie. Elles ont un diamètre moyen de 15 µm. Les cellules sont en suspension dans du milieu RPMI et cultivées en incubateur (37°C et CO₂ à 5%). Une étape de renouvellement du milieu, nommée « passage », est réalisée tous les 7 jours dans des flasques de culture. Ce renouvellement a pour but de maintenir les cellules à une densité cellulaire optimale (ne dépassant pas 1 million cellules/ml), car elles peuvent subir certaines modifications morphologiques si elles sont trop stressées. Les cellules sont dénombrées, puis centrifugées. Le culot est ensuite suspendu dans du milieu frais. Les cellules sont utilisées jusqu'au passage 30. Le temps de doublement du nombre des cellules est d'environ 26 heures. Pour atteindre la concentration souhaitée, Nous partons de la concentration de la solution mère. Le protocole de préparation est similaire ensuite à celui des billes, qui est présenté à la Figure III. 1(b).

La suspension de particules est ensuite injectée dans le microcanal du biocapteur.

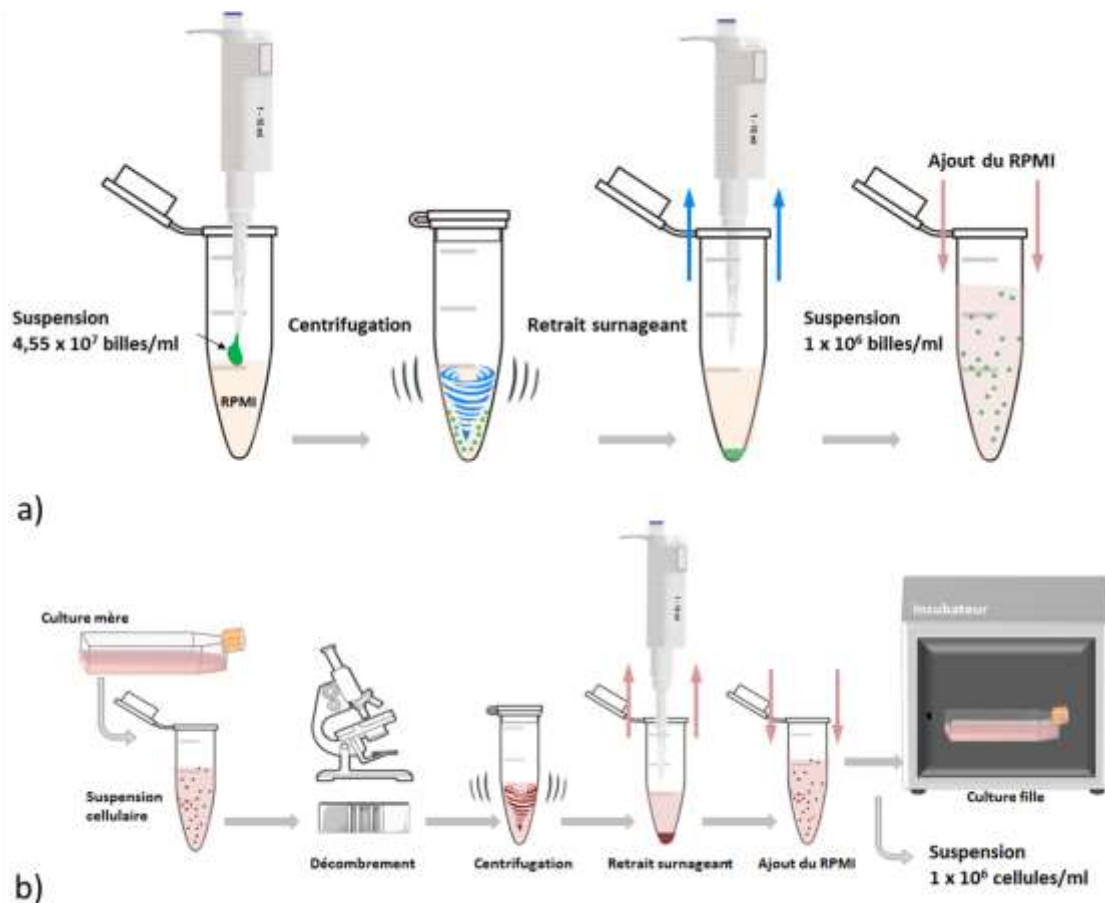


Figure III. 1 (a) protocole de préparation de billes, (b) protocole de culture et préparation de cellules THP1

I.1.2 Répétitivité des mesures

I.1.2.a Mesures de billes de polystyrène dans le milieu RPMI

Nous avons d'abord mesuré des billes de polystyrène dans du milieu RPMI. Six mesures ont été effectuées, avec le même biocapteur. Le résultat est montré à la Figure III. 2, les spectres des contrastes capacitif et conductif extraits ainsi que les écarts-types (Standard deviation – Std) correspondants sont tracés en fonction de la fréquence jusqu'à 40 GHz. La référence utilisée dans ce cas est donc le milieu RPMI, qui correspond à la ligne "zéro" en abscisse de la figure. Le contraste capacitif ΔC atteint autour de 5GHz vaut : -1 fF, avec un écart-type de 4%, tandis que le ΔG maximal est atteint alentour de 40 GHz et vaut -0,085 mS avec un écart-type de 9%.

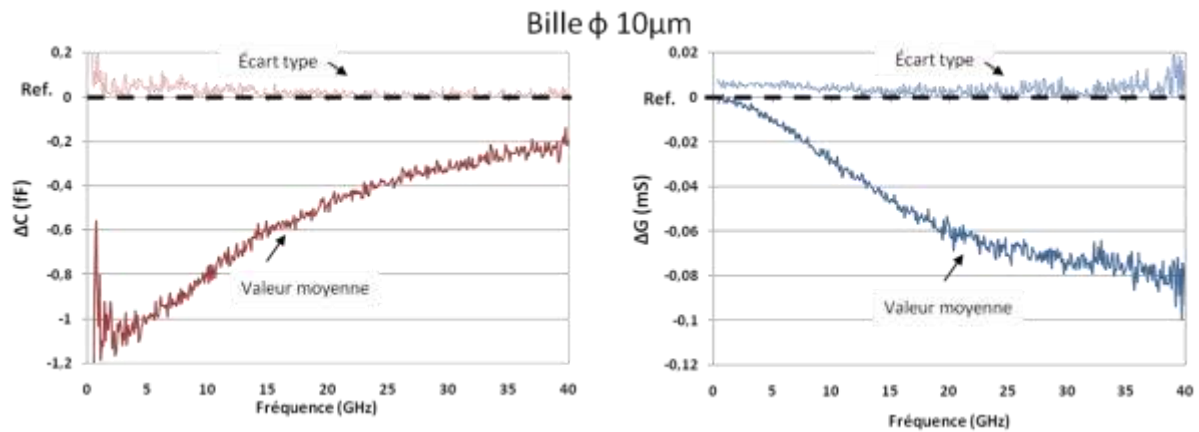


Figure III. 2 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) moyennés et écart-types correspondants pour six mesures des billes de diamètre de 10 μm dans du milieu RPMI.

I.1.2.b Mesures de cellules dans le milieu RPMI

De la même façon, l'expérience est reproduite avec des cellules THP1 directement dans leur milieu de culture. Six mesures ont été effectuées, avec le même biocapteur. Le résultat est montré sur la Figure III. 3. Les spectres représentent les contrastes capacitif et conductif moyennés et les écarts-types correspondants. Nous obtenons également un contraste ΔC maximal à 5 GHz qui vaut -0,44 fF, avec un écart-type de 7%, tandis que le ΔG à 40 GHz vaut -0,042 mS, avec un écart-type de 14%.

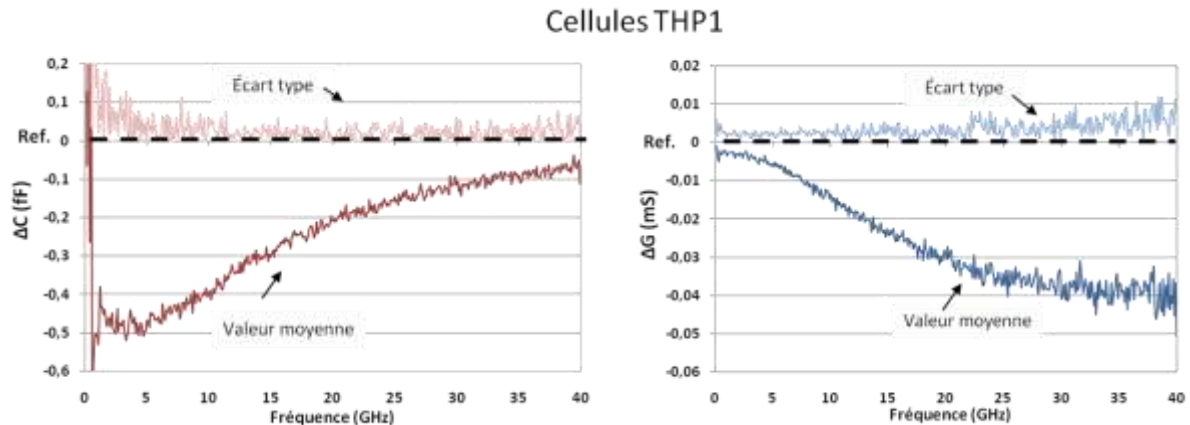


Figure III. 3 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) moyennés et les écart-types correspondants de six mesures des cellules THP1 vivantes, directement dans leur milieu de culture RPMI

Le contraste capacitif de la cellule est inférieur à celui de la bille. Ceci est lié à leurs permittivités effectives relatives respectives. En effet, la permittivité de la cellule est proche du milieu de culture, et notamment de l'eau (de 80 à 30 en fonction de la fréquence), alors que les billes de polystyrène présentent une permittivité constante en fonction de la fréquence avec une valeur proche de 2,5.

I.1.2.c Comparaison des mesures de cellules avec la technologie SU-8 et Film Sec

Les deux expériences précédentes ont été effectuées avec des composants fabriqués avec la technologie SU-8. Une nouvelle technologie film sec DF a été

présentée à Chapitre II, qui possède des avantages en termes de coût et de temps de fabrication. Cette expérience consiste à évaluer les nouveaux biocapteurs fabriqués avec les cellules.

Six cellules sont également mesurées avec le même biocapteur en film sec DF. Les contrastes ΔC et ΔG des mesures sont extraits, et les spectres de leurs valeurs moyennes sont présentés à la Figure III. 4. Les contrastes issus de l'ancienne expérience sont ajoutés à la figure afin de permettre la comparaison des deux technologies. Les contrastes obtenus par les 2 composants ont des écarts de 0,15 fF et 0,004 mS pour les ΔC à 5 GHz et ΔG à 40 GHz. Puis, l'écart-type du ΔC des deux technologies reste le même, 8%, mais l'écart-type du ΔG de la technologie Film Sec vaut 8%, il est bien inférieur à celui de SU-8 (14%). Les mesures en hautes fréquences sont un peu moins bruitées.

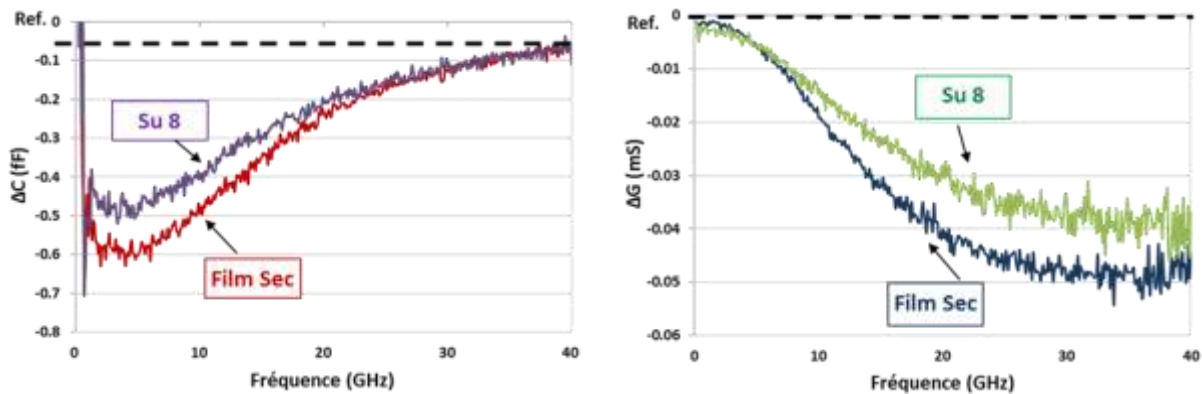


Figure III. 4 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) moyennés pour cellule vivante dans des composants réalisés en technologies film sec DF et SU-8

L'écart obtenu entre les 2 technologies peut être attribué à un meilleur alignement des bloqueurs par rapport à la coupure capacitive. En effet, le positionnement de la particule dans la zone de détection a un impact sur les contrastes diélectriques. Un exemple est montré à la Figure III. 5(a), il présente un biocapteur ayant un gap capacitif de 5 μm et un Piège Flotteur, les deux cercles indiquent la position idéale (vert en pointillée) et la position réelle (rouge en courbe pleine) d'une bille de diamètre 10 μm . Nous pouvons voir que la position réelle est décalée de 1,2 μm en axe X et 3,7 μm en axe Y, par rapport à la position idéale au centre de la zone de détection. Les résultats de simulations et de mesure d'une bille de polystyrène dans de l'eau DI sont représentés sur la Figure III. 5(b). Nous pouvons observer qu'il y a une bonne concordance entre la simulation et la mesure pour de la position réelle. Le résultat de la simulation montre un écart de 0,4 fF à 5 GHz entre les positions idéale et réelle, soit env. 25% sur le ΔC à 5 GHz de la bille mesurée. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que lorsque la particule se décale de la position idéale, la proportion des matériaux diélectriques en interaction avec le champ électromagnétique diminue.

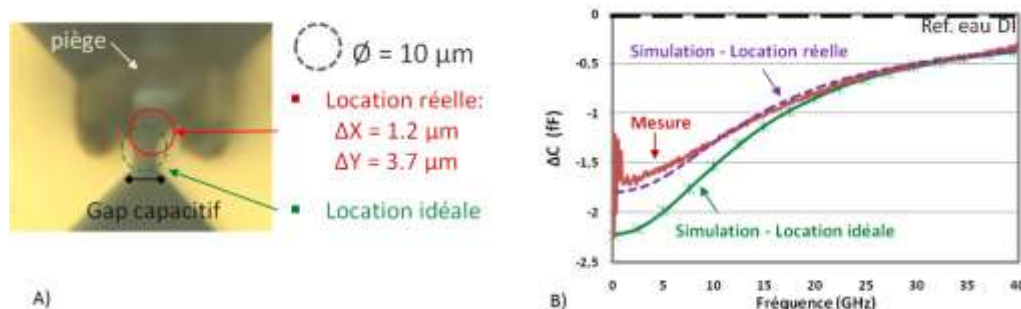


Figure III. 5 Impact de la position de la particule : (a) position réelle et idéale, (b) contrastes capacitifs des résultats de simulation et mesure

Malgré un temps de développement un peu plus long que prévu, les nouveaux biocapteurs ont été réalisés très récemment, et s'utilisent pour les expériences du suivi en temps réel.

Pour conclure nos expériences sur la répétabilité des mesures du biocapteur, un résumé des contrastes capacitif et conductif pour cellules et billes uniques en milieu RPMI, ainsi que les écart-types correspondants, entre parenthèse, est présenté au Tableau III. 1. Les écart-types de cellules sont plus importants, ils peuvent être expliqués par l'hétérogénéité des cellules, qui présentent intrinsèquement des variations en termes de position dans le cycle cellulaire et diamètre. Comme nous avons démontré au chapitre II, le diamètre de la particule mesurée a un fort impact sur les contrastes diélectriques : 10% par variation de 1 μm de diamètre dans le cas de bille unique dans de l'eau DI. La mesure HF de cellule biologique vivante est difficile en raison de contrastes diélectriques extrêmement faibles. Cependant nous avons obtenu une très bonne répétabilité de mesure.

Tableau III. 1 Résumé des contrastes capacitif et conductif à 5 et 40 GHz respectivement, et les écart-types correspondants, de cellules biologiques et billes de polystyrène dans un milieu de culture cellulaire

Dans le milieu RPMI	ΔC (fF) à 5 GHz		ΔG (mS) à 40 GHz	
	Val. moy	Std	Val. moy	Std
Bille $\phi 10 \mu\text{m}$	-1	(0,04) 4%	-0,085	(0,0074) 9%
Cellule unique SU-8	-0,44	(0,031) 7%	-0,042	(0,0046) 14%
Cellule unique Film Sec	-0,59	(0,046) 8%	-0,046	(0,0035) 8%

I.1.3 Répétabilité des mesures de cellules dans le milieu RPMI

Pour cette étude de la répétabilité des mesures, trois expériences sont effectuées avec différents biocapteurs (fabriqués avec la technologie SU-8, et avec une coupure capacitive de 5 μm et un Piège Flotteur) et répartis sur 15 jours. Pour chaque expérience, six cellules vivantes THP1 ont été mesurées. Le résultat est montré sur la Figure III. 6.

Les spectres représentent les contrastes capacitif et conductif moyennés, les chiffres affichés représentent les valeurs du ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement. Nous obtenons des contrastes ΔC maximaux à 5 GHz qui sont aux alentours de -0,45fF avec un écart-type de 5%, tandis que les ΔG à 40 GHz sont aux alentours -0,042 mS, avec un écart-type de 6%. Ces mesures nous permettent de démontrer leur répétabilité.

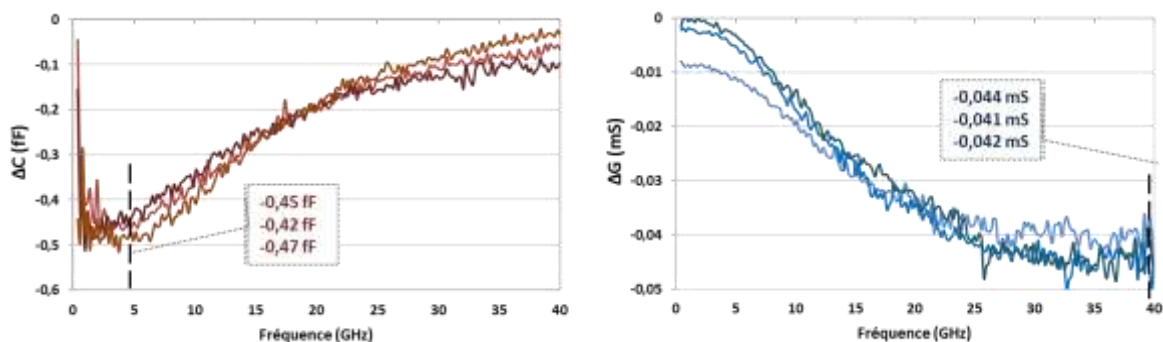


Figure III. 6 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) moyennés pour cellule vivante dans des différents composants réalisés en technologies SU-8 et à différents jours.

I.2 Discrimination de cellules vivante, morte et traitée

Suite à ces travaux, nous nous sommes intéressés à la discrimination de différents états pathologiques avec la mort des cellules induites de différentes manières. Nous avons mesuré les cellules THP1 vivantes traitées sous différentes conditions. Un lot de cellules vivantes a été divisé en cinq sous-lots de 0,2 ml :

- lot 1 : Sans traitement, ce sont nos cellules vivantes témoins,
- lot 2 : Mort naturelle, avec nos cellules laissées à l'ambient pendant 24 heures et appauvrissement progressif du milieu de culture,
- lot 3 : Traitement thermique à 45°C pendant 20min,
- lot 4 : Traitement thermique à 50°C pendant 30min,
- lot 5 : Traitement chimique en ajoutant du DMSO 10% dans la suspension de cellules pendant 10 – 20min.

Nous avons effectué la spectroscopie diélectrique pour chaque cas.

I.2.1 Cellule morte par appauvrissement du milieu de culture à température ambiante

Cette expérience consiste à mesurer la réponse HF des cellules THP1 mortes, et examiner les différents états physiologiques de la cellule. Afin de tuer les cellules, nous

avons placé le **lot 2** en environnement ambiant pendant 24H, les cellules sont hors de leurs conditions de culture optimales, mortes par manque de nutriments avec l'appauvrissement progressif du milieu de culture. Pour le lot 1 (cellules vivantes) et lot 2 (cellules mortes), nous avons effectué 10 et 6 mesures respectivement, leurs contrastes capacitif et conductif ont été extraits. La Figure III. 7 présente les contrastes ΔC et ΔG extraits pour 5 mesures de chaque cas. Leurs valeurs à 5 GHz et 40 GHz respectivement sont résumées à la Figure III. 8.

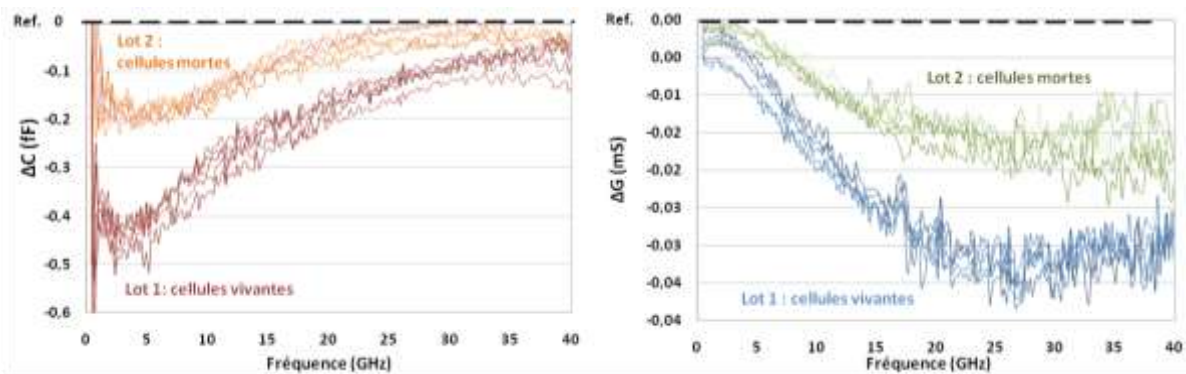


Figure III. 7 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) des cellules mortes et vivantes dans le milieu RPMI

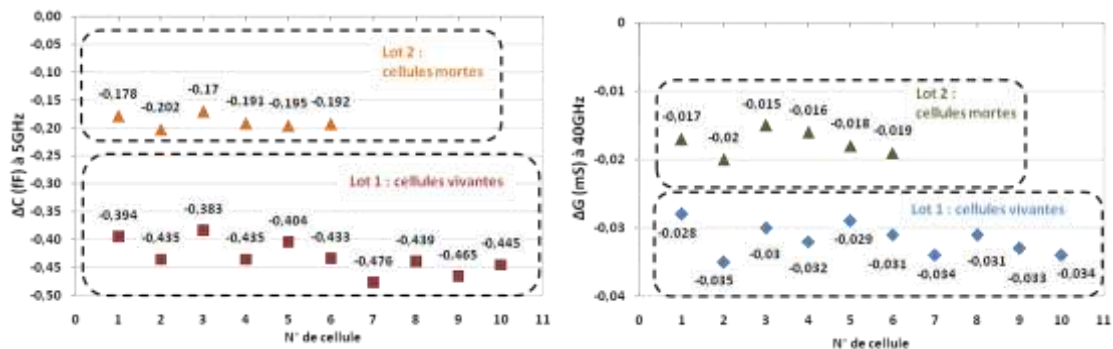


Figure III. 8 Résumé des contrastes capacitif à 5 GHz (gauche) et conductif à 40 GHz (droit) des cellules mortes et vivantes en milieu RPMI

Nous pouvons observer un écart significatif des contrastes entre cellules mortes et cellules vivantes. Dans le cas des cellules mortes, la membrane de la cellule étant perméable, le contraste milieu intracellulaire / milieu extracellulaire est plus faible que pour le cas des cellules vivantes, ce qui explique les valeurs de contrastes plus faibles pour les cellules mortes par rapport aux cellules vivantes. Un résumé des contrastes capacitif et conductif pour cellules vivantes et mortes en milieu RPMI, ainsi que les écart-types correspondants, entre parenthèse, est présenté au Tableau III. 2.

Tableau III. 2 Résumé des contrastes capacitif et conductif à 5 et 40 GHz respectivement, et les écart-types correspondants, de cellules biologiques vivantes et mortes dans un milieu de culture RPMI

Dans le milieu RPMI	ΔC (fF) à 5 GHz		ΔG (mS) à 40 GHz	
	Val. moy	Std	Val.moy	Std
Cellule unique vivante	-0,42	(0,03) 7%	-0,032	(0,0024) 7%
Cellule unique morte	-0,19	(0,012) 6%	-0,018	(0,0019) 11%

En valeur moyenne :

- le ΔC à 5 GHz vaut -0,42 fF pour une cellule vivante et -0,19 fF pour une cellule morte, soit un écart de 0,23 fF,
- le ΔG vaut -0,032 mS pour une cellule vivante et -0,018 mS pour une cellule morte, soit un écart de 0,014 mS.

I.2.2 Cellule vivante soumise à un traitement thermique

L'expérience précédente consiste à évaluer les contrastes diélectriques des cellules mortes. Dans cette expérience, l'étude porte sur les cellules soumises à un stress thermique. Les études [2] démontrent une diminution de la viabilité des cellules en augmentant la température, comme montré à la Figure III. 9. Et les études [3] démontrent que le changement de température de 37°C à 42°C induit un stress qui entraîne des changements de la forme et la texture de la cellule. Ces changements indiquent des processus de mort cellulaire dans ce cas (Figure III. 10).

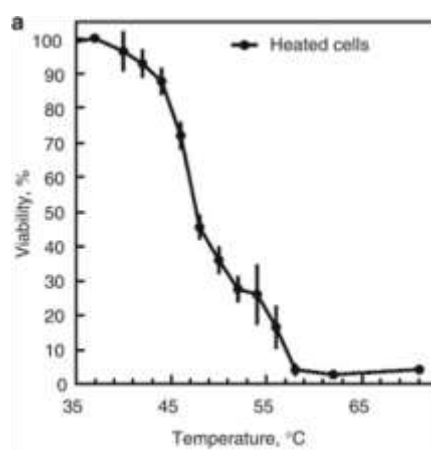


Figure III. 9 La viabilité des cellules chauffées en fonction de la température (reproduit de [2])

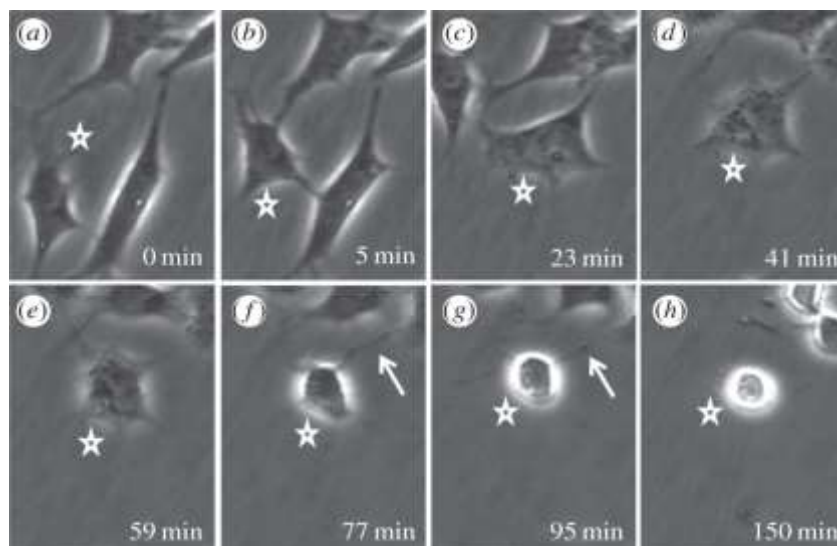


Figure III. 10 Images de cellules lorsque soumise à une température de 45°C sur une période de 150 minutes au cours de laquelle les cellules modifient leur morphologie qui caractérise la mort cellulaire (reproduit de [3])

Pour cette expérience, nous avons mis les solutions de cellules lot 3 et lot 4 au bain marie à 45°C et 50°C respectivement.

Lot 3 : il a été mis à chauffer à 45°C pendant 20 min. Huit cellules de ce lot ont été mesurées. Leurs contrastes ΔC et ΔG ont été extraits et sont présentés sur la Figure III. 11. Nous pouvons voir que les spectres des contrastes sont très éparpillés. Et pour mieux comprendre le comportement des cellules, les valeurs de ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz sont résumées et comparées à celles de cellules vivantes et mortes à la Figure III. 12. Nous pouvons observer que :

- trois cellules ont une faible valeur de contraste proche de celle d'une cellule morte,
- trois cellules ont une valeur de contraste intermédiaire, entre une cellule morte et vivante,
- deux cellules ont une valeur de contraste élevée, elles ont une augmentation d'environ 23% par rapport à une cellule vivante.

Ce résultat peut être expliqué par le changement métabolique des cellules sous l'influence de la chaleur: certaines s'affaiblissent et enclenchent un processus de mort cellulaire, qui fait que la différence extracellulaire / intracellulaire diminue, et donc les contrastes diélectriques diminuent également. Dans le cas contraire, certaines ont un diamètre plus important, sachant que le biocapteur est sensible à la taille de la particule piégée, ce qui fait que leurs contrastes diélectriques sont plus importants.

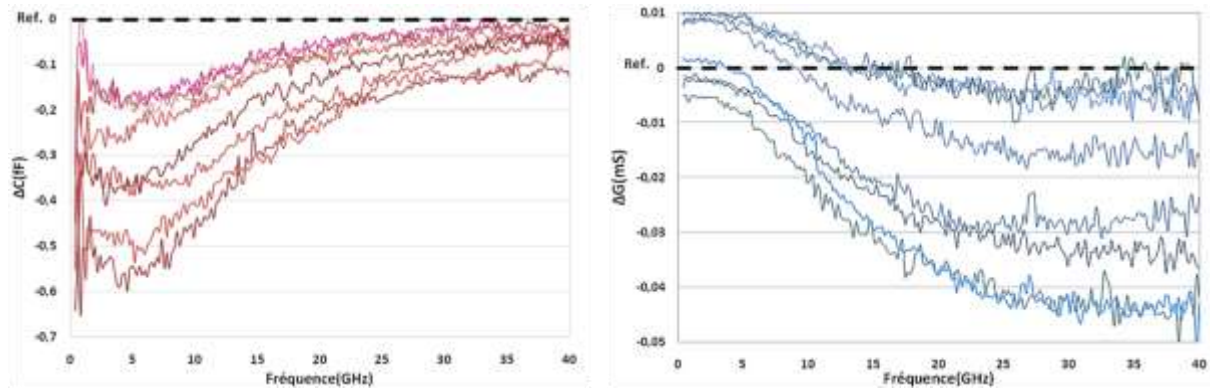


Figure III. 11 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) des cellules traitées 45°C pendant 20min.

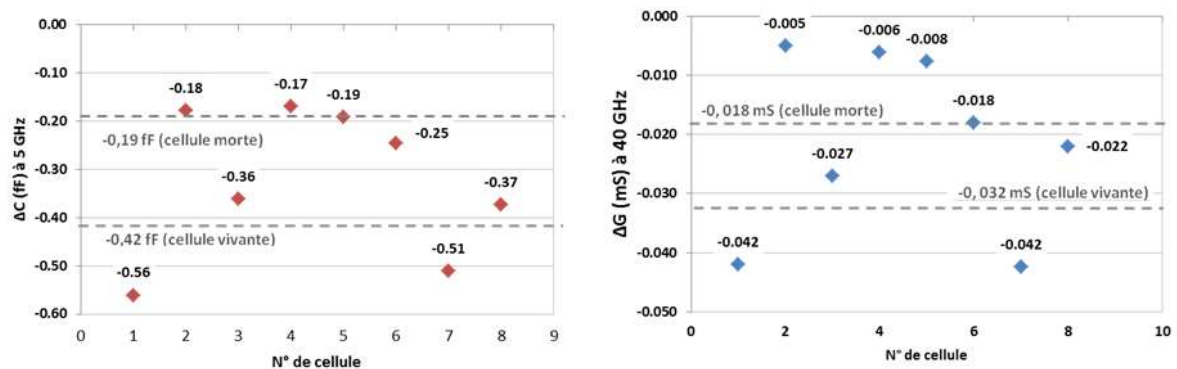


Figure III. 12 Résumé des contrastes capacitif à 5 GHz (gauche) et conductif à 40 GHz (droite) des cellules traitées 45°C pendant 20min.

Lot 4 : la solution de cellules est chauffée à 50°C pendant 30min. Nous avons reproduit la même expérience que pour le cas précédent. Sept cellules de ce lot ont été mesurées. Leurs contrastes ΔC et ΔG ont été extraits et sont présentés sur la Figure III. 13. De la même façon, pour les valeurs de ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz, elles sont résumées et comparées à celles de cellules vivantes et mortes à la Figure III. 14. Pour chaque cas, nous pouvons distinguer clairement deux comportements de cellules : trois parmi elles ont une faible valeur de contraste qui est proche de celle d'une cellule morte. Et quatre cellules ont une valeur de contraste qui est proche de celle d'une cellule vivante.

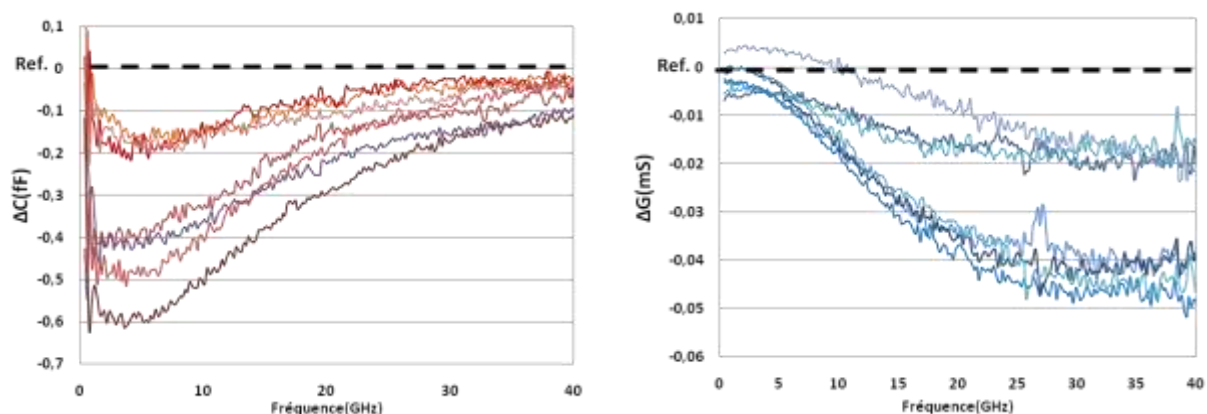


Figure III. 13 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) des cellules traitées 50°C pendant 30min

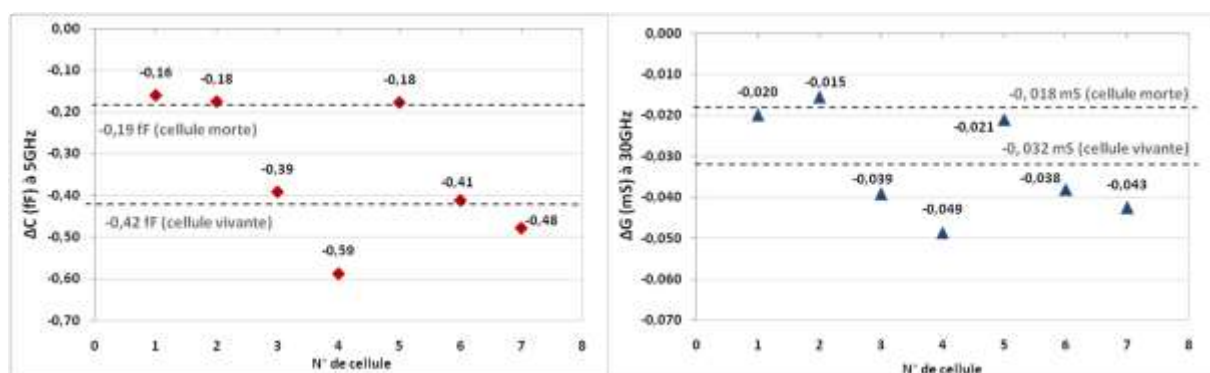


Figure III. 14 Résumé des contrastes capacitif à 5 GHz (gauche) et conductif à 40 GHz (droite) des cellules traitées 50°C pendant 30min

I.2.3 Cellule vivante soumise à un traitement chimique

Nous reproduisons cette fois une expérience HF avec des cellules soumises à un traitement chimique, par un agent chimique dite DMSO. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un solvant organique aprotique, miscible à l'eau. En biologie, le DMSO est utilisé comme agent cryoprotecteur pour la congélation de cellules [4], ainsi que comme agent perméabilisant réversible. Il possède des propriétés de perméabilisation des membranes [5], [6]. La perméabilisation a pour but de faire entrer ou sortir des molécules qui ne peuvent pas traverser la membrane plasmique à l'état naturel. Cela peut être utile pour faire entrer des médicaments par exemple.

Des études ont été menées pour comprendre les changements au niveau des lipides de la membrane en présence de DMSO [7], [8]. Les observations [8] suggèrent une augmentation de la perméabilité membranaire en présence de DMSO. À une concentration jusqu'à 10 mole%, le DMSO entraîne une diminution de l'épaisseur de la membrane et augmente la fluidité de celle-ci, puis il génère des pores hydrophiles dans la membrane. Et à une concentration plus importante, les lipides sont désorbés de la membrane, ce qui est suivi par une destruction de celle-ci (Figure III. 15). Les

études [7] ont montré le changement morphologique des cellules DC-3F incubées à différentes concentrations volumiques de DMSO (Figure III. 16).

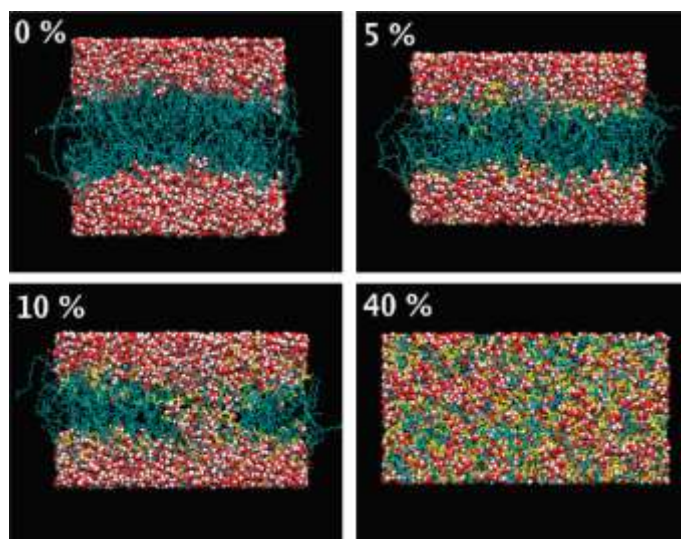


Figure III. 15 Les différentes actions du DMSO sur les membranes plasmiques. Vues de côté des structures finales après simulation des systèmes de bicouches contenant 0, 5, 10 et 40 mol% de DMSO. Les lipides sont représentés en cyan, l'eau en rouge et le DMSO en jaune (reproduit de [8])

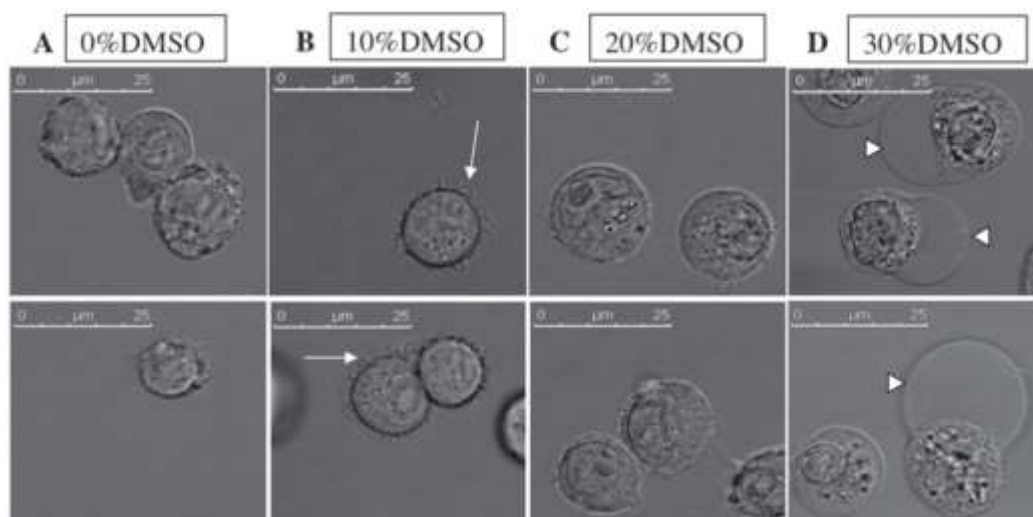


Figure III. 16 Morphologie des cellules DC-3 (A) sans DMSO, (B) en présence de 10% de DMSO, avec des ondulations de membrane, (C) le gonflement des cellules en présence de 20% de DMSO, (D) endommagement de la membrane (reproduit de[7])

Nous avons réalisé une expérience HF des cellules traitées au DMSO. La viabilité / mortalité des cellules est d'abord évaluée par un test au bleu de Trypan, à différentes concentrations de DMSO. Le bleu de Trypan est un colorant vital, qui colore les cellules mortes en bleu. Ce résultat est montré à la Figure III. 17. Pour la concentration 10% DMSO, la mortalité de cellules est alentour de 23% pour une période de 10 – 20min de traitement.

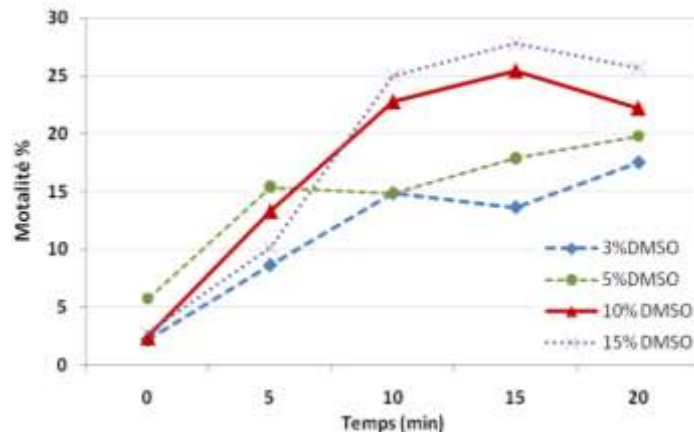


Figure III. 17 Test de viabilité des cellules par la méthode de coloration au bleu de Trypan pour différentes concentrations de DMSO

Nous avons ajouté cette concentration de 10% DMSO dans la suspension de cellules **Lot 5**, ce qui correspond à une mortalité de 25%. À partir de 10min de traitement, nous avons commencé à mesurer les cellules. Sept cellules ont été mesurées, une après une, les spectres de contrastes capacitif et conductif sont montrés à la Figure III. 18.

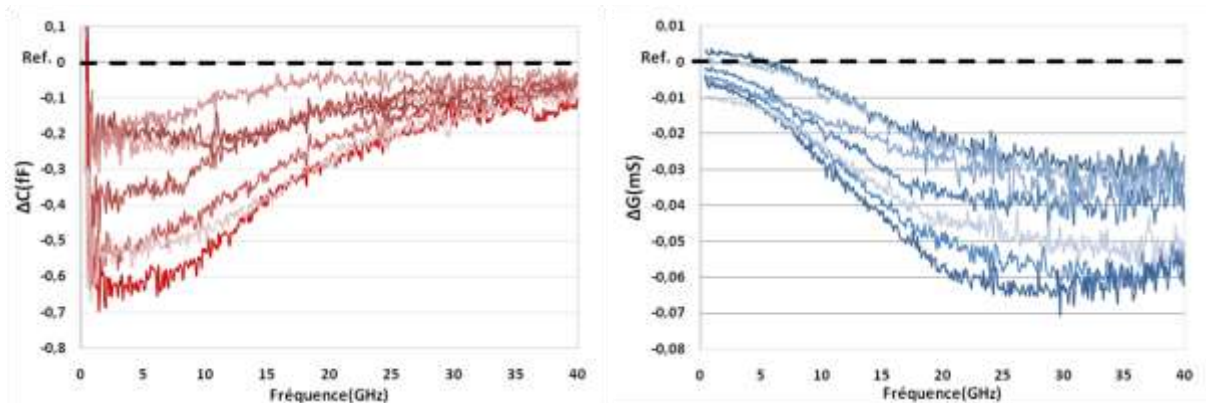


Figure III. 18 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) des cellules traitées avec DMSO à 10%

Afin de mieux distinguer l'état physiologique des cellules, les valeurs de ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement sont résumées et comparés au résultat issu des expériences précédentes (lot 1 et lot 2), comme montré à la Figure III. 19. Nous observons que :

- Pour le contraste ΔC , trois cellules mesurées ont une faible valeur de contraste, elles sont mortes. Une cellule ayant une valeur de contraste un peu plus faible que celle d'une cellule vivante, elle est perméabilisée, le contraste intracellulaire / extracellulaire diminue. Puis, trois autres cellules ont une forte valeur de contraste, indiquant qu'elles sont vivantes.
- Le comportement du contraste ΔG n'est pas aussi clair que celui du contraste ΔC . Quatre parmi sept ont une valeur de contraste proche de celle d'une cellule vivante et trois autres cellules ont une valeur de contraste très élevée, presque d'un facteur 2. Nous supposons que ce résultat est principalement lié à la

présence des molécules de DMSO sur la membrane plasmique ainsi que dans la cellule. Dans le chapitre II, nous avons montré que le biocapteur est capable de détecter de très faibles traces d'éthanol (0,078%). Pour la même raison, les molécules DMSO ont une influence sur la réponse HF du système, elles apportent plus de pertes diélectriques.

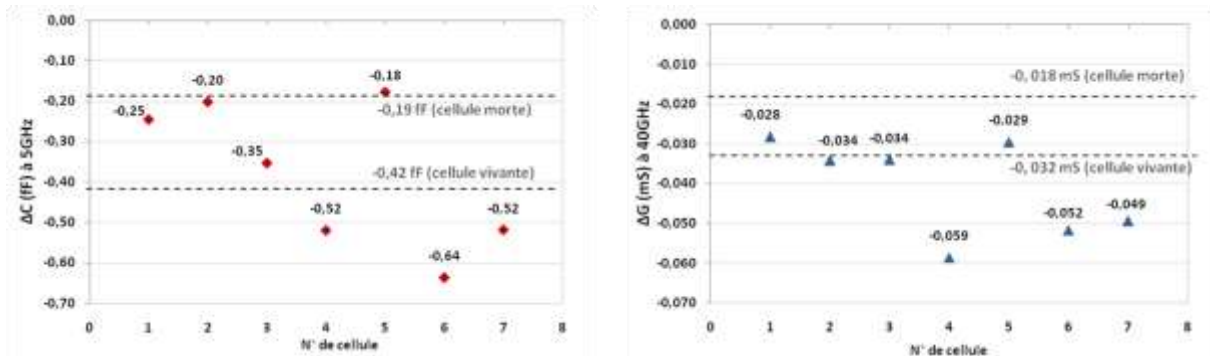


Figure III. 19 Résumé des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) à 5 et 40 GHz respectivement des cellules traitées avec DMSO à 10%

Conclusions et perspectives

Les résultats de ces expériences statiques montrent que notre biocapteur est capable, grâce à la technique d'extraction des contrastes capacitif et conductif, de caractériser non seulement des cellules vivantes, mais également des cellules mortes et soumises à différents traitements thermiques et chimique, directement dans leur milieu de culture. De plus, le système montre une très bonne répétitivité et répétabilité des mesures, alors que nous sommes amenés à mesurer des échantillons à forte variabilité car vivants.

Ces expériences ouvrent la voie à une discrimination d'état cellulaire en temps réel de manière non-invasive.

II Expérimentations Dynamique en temps réel

Dans cette section, nous nous focalisons sur l'évaluation des performances du biocapteur pour l'analyse de matériaux biologiques en temps réel. Une nouvelle version de l'interface homme-machine MATLAB® est d'abord présentée ainsi que sa validation. Ensuite, nous allons présenter le suivi en temps réel des cellules THP1 unique dans leur milieu de culture. Cette étude démontre que notre biocapteur est capable de discriminer des variations biologiques d'une cellule unique en temps réel.

II.1 Interface Homme-Machine

II.1.1 Fonctions d'acquisition

Cette version de l'interface HM est basée sur son ancienne version de mesures statiques, en intégrant un **timer**. Le timer permet d'effectuer l'ensemble des opérations (enregistrer et de traiter les données de mesure et enfin d'afficher les résultats d'analyse) périodiquement une durée de temps définie.

Les fonctions d'acquisition de l'interface HM en temps réel sont décrites et illustrées sur la Figure III. 20 :

- **Initialisation** : elle permet de lancer une nouvelle mesure et de créer un nouveau dossier nommé 'nom du composant' qui est répertorié dans le dossier 'date' du jour de la manipulation.
- **Procédé De-embedding** : cette étape de prétraitement du biocapteur est présentée dans le chapitre II. Cette fonction analyse et enregistre les paramètres de deux structures THRU, à partir des données brutes mesurées.
- **Acquisition fichiers de référence** : elle propose d'enregistrer les fichiers de données brutes des références et de les stocker dans le dossier de mesure créé. La fonction 'Ref.' permet soit d'enregistrer un nouveau fichier de référence, soit de charger un fichier de référence existant.
- **Acquisition et traitement en temps réel** : elle propose d'enregistrer les données de mesures brutes de la cible, de les traiter puis d'afficher le résultat des mesures, pour chaque période de temps définie. Les fonctions 'Start' et 'Stop' permettent de lancer et d'arrêter l'opération. La fonction 'Reset' propose d'effacer les spectres de mesures sur l'écran, et de remettre le nombre de mesure à zéro.

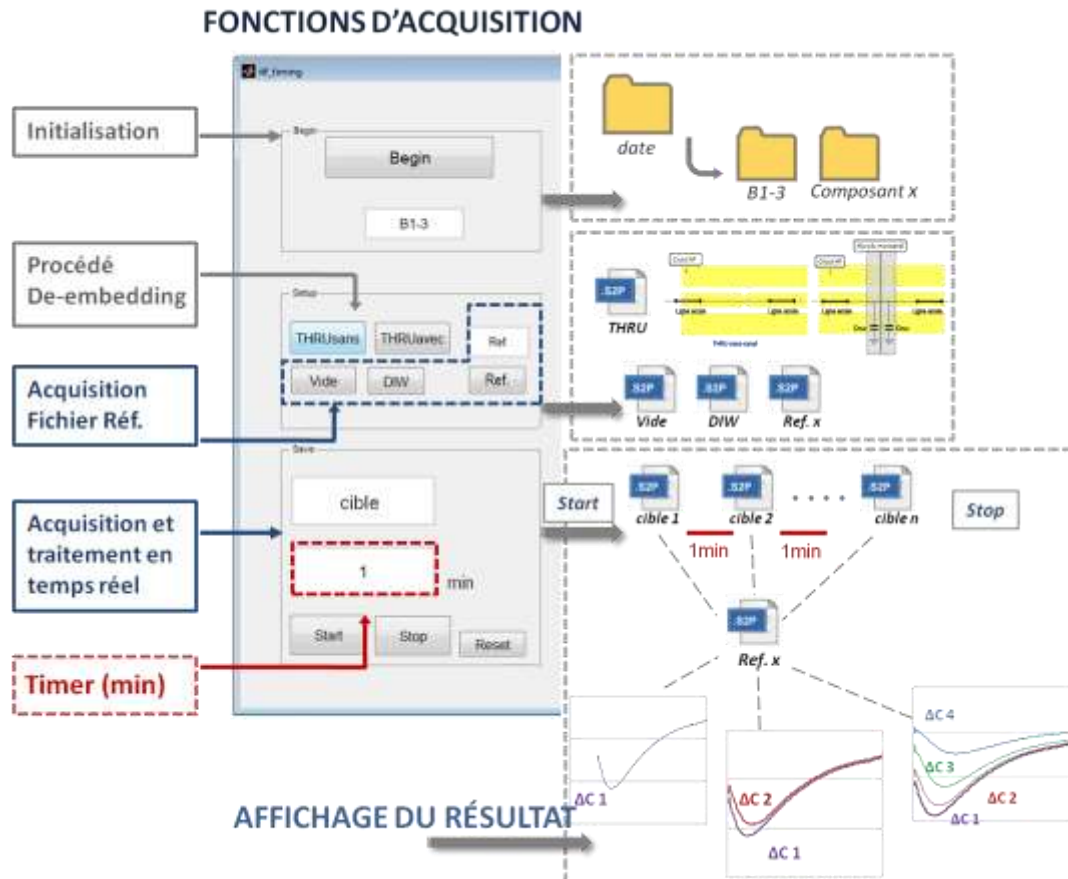


Figure III. 20 Fonctions d'acquisition de l'interface HM temps réel

II.1.2 Validation

II.1.2.a Mesures en temps réel de l'évaporation d'éthanol

La validation des nouvelles fonctions d'acquisition de l'interface HM est d'abord effectuée avec des mesures de mélanges binaires éthanol/eau, pour deux différentes concentration volumique en éthanol: 30% et 50%. L'expérience consiste à d'abord remplir le microcanal avec le mélange binaire, sans nouvelle injection pour la suite. Puis les mesures sont lancées toutes les minutes (timer =1 min), jusqu'à évaporation de liquide dans le canal.

Pour la première concentration éthanol à 30%, la durée de mesures est de 7min, les huit spectres des contrastes capacitif et conductif sont montrés à la Figure III. 21. Nous pouvons observer clairement une diminution de deux contrastes diélectriques au cours des mesures. C'est normal, parce que l'éthanol est un solvant qui s'évapore plus vite que de l'eau pure. Par conséquent la concentration en éthanol dans le mélange binaire diminue. Le contraste ΔC maximal est atteint aux alentours de 10 GHz et le contraste ΔG maximal est atteint à 40 GHz.

Les variations des contrastes ΔC et ΔG maximaux en fonction du temps sont résumées à la Figure III. 22, les deux contrastes ont un comportement similaire. La variation est modérée pour les 2 premières minutes puis elle devint importante de 2 à

5 minutes : le ΔC varie de +2,1 fF/min et le ΔG varie de +0,26 mS/min. Mais peu de variation est observée pour les deux dernières minutes : le ΔC ne varie que 0,09 fF/min et le ΔG ne varie que +0,006 mS/min. Les valeurs finales des ΔC et ΔG sont -1,19 fF et -0,117 mS qui correspondent à une concentration d'éthanol est proche de 0,3% d'après notre expérience précédente (Chapitre II).

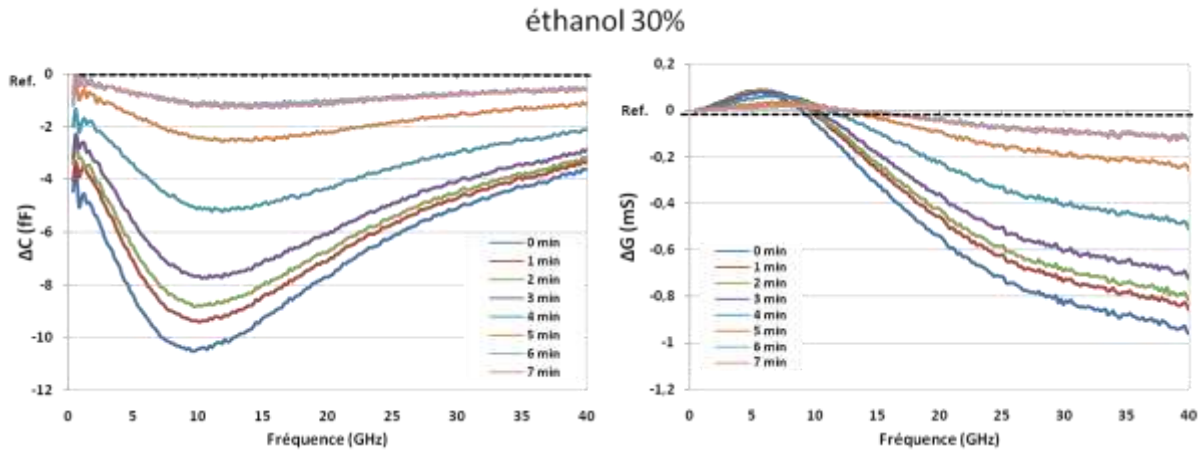


Figure III. 21 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) des mesures de la concentration éthanol à 30 %, pendant une durée de 7min

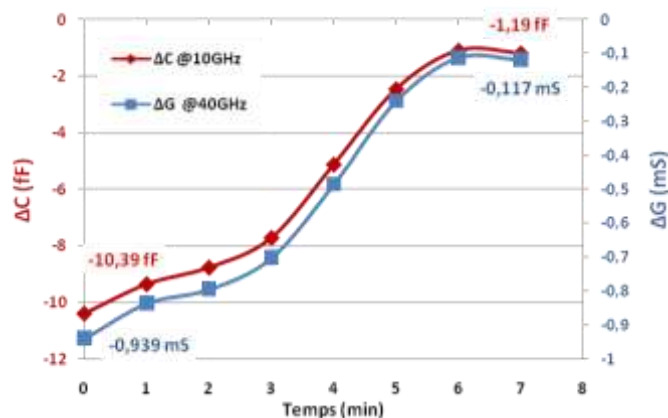


Figure III. 22 Variation des contrastes ΔC et ΔG en fonction du temps de la concentration éthanol à 30 % pendant 7min

De la même manière, nous avons reproduit la même expérience avec une concentration éthanol à 50%. La durée de mesures est de 6min, les sept spectres des contrastes capacitif et conductif sont montrés à la Figure III. 23 et les variations des contrastes ΔC et ΔG à 10 GHz et 40 GHz en fonction du temps sont résumées à la Figure III. 24. Le comportement des ΔC et ΔG est similaire : peu de variation pour la première minute, puis elle est importante de 1 à 4 minutes : +3,1 fF/min et +0,276 mS/min respectivement. Enfin la variation est ralentie pour les deux dernières minutes, les variations de ΔC et ΔG sont +1,14 fF/min et +0,11 mS/min respectivement. Puis, avec les valeurs finales de ΔC et ΔG , nous déduisons que la concentration finale est très proche de 5%.

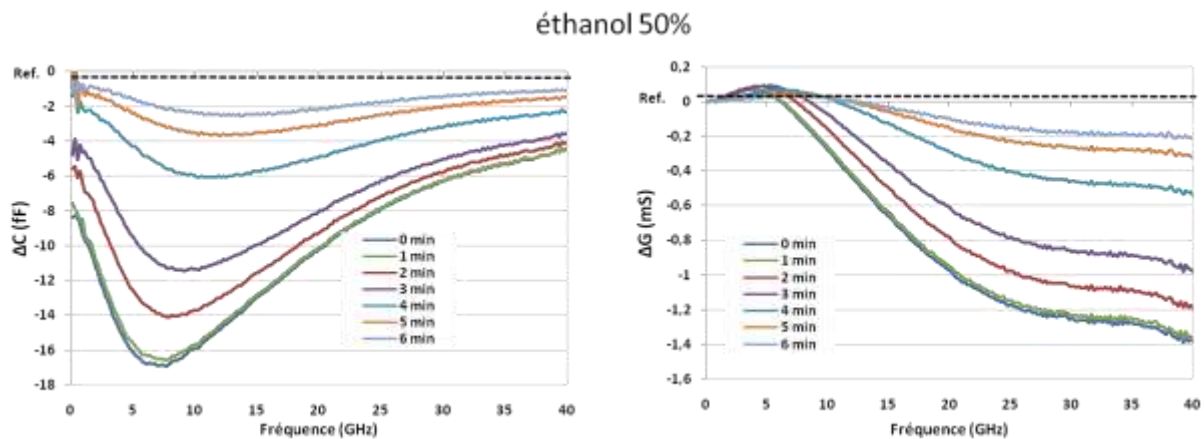


Figure III. 23 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droite) des mesures de la concentration éthanol à 50 %, pendant une durée de 6 min

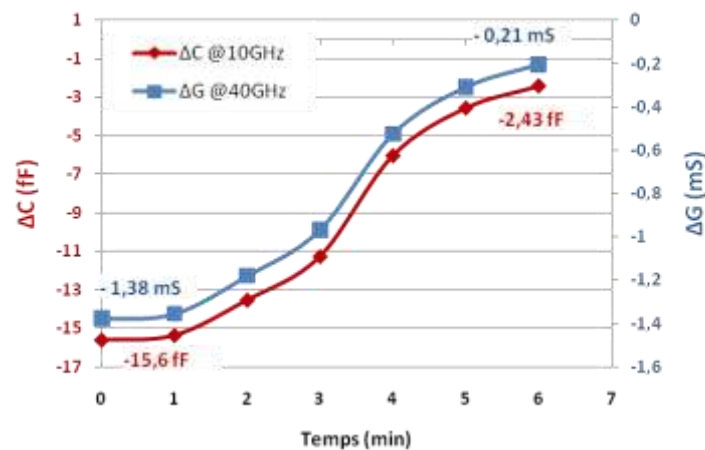


Figure III. 24 Variation des contrastes ΔC et ΔG en fonction du temps de la concentration éthanol à 50 %, pendant une durée de 6 min

L'objectif de ces mesures d'évaporation d'éthanol n'avait pour but que de démontrer la capacité de suivi en temps réel de notre biocapteur muni de son environnement instrumental. Les résultats d'évaporation des 2 concentrations d'éthanol amènent ainsi la preuve expérimentale de cette capacité. Les investigations suivantes vont, quant à elles, démontrer la capacité de suivi longitudinal pour des situations biologiquement pertinentes.

II.1.2.b Étude de la répétitivité du suivi en temps réel

Cette étude a pour but de relever les performances en répétitivité des mesures du biocapteur en cas de suivi en temps réel. Différents états du biocapteur ont été évalués : lorsque le microcanal est rempli d'air (vide), d'eau DI, de milieu de culture cellulaire RPMI et avec une bille de diamètre 10 μm dans du milieu RPMI. Toutes les expériences sont effectuées avec le même biocapteur ayant un gap capacitif de 5 μm et un Piège Flotteur, avec une vitesse du flux de 1 mm/s, maintenue tout au long de la manipulation.

La durée de mesure pour l'air est de 15 min avec un timer à 3min. Puis pour les solutions aqueuses, la durée de mesure est de 16 min avec un timer à 2min. Nous avons extrait la capacité et la conductance pour chaque cas. La Figure III. 25 et la Figure III. 26 illustrent les valeurs de capacité et conductance à 5 GHz et 40 GHz respectivement.

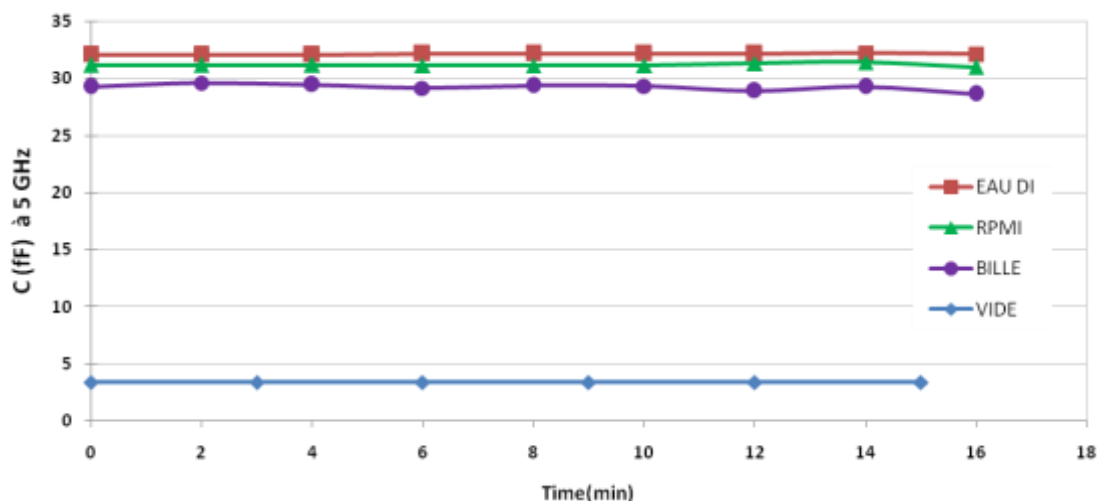


Figure III. 25 Valeurs de capacité 5 GHz du suivi en temps lorsque le microcanal est rempli d'air (vide), d'eau DI, de milieu RPMI et avec une bille de diamètre de 10 μm dans du milieu RPMI

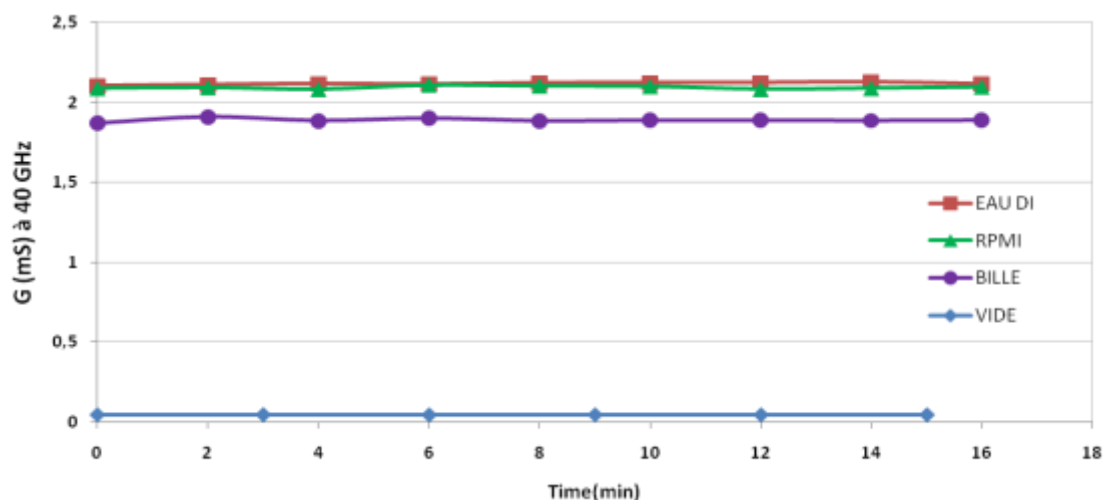


Figure III. 26 Valeurs de conductance à 40 GHz du suivi en temps lorsque le microcanal est rempli d'air (vide), d'eau DI, de milieu RPMI et avec une bille de diamètre de 10 μm dans du milieu RPMI

Le Tableau III. 3 résume des valeurs de capacité et conductance, ainsi que les écart-types, entre parenthèses, correspondants. Les écart-types de billes sont plus importants, ils peuvent être expliqués par le micromouvement des billes dans du flux, qui entraîne de petits changements de position de la bille par rapport à la zone de détection, et par la variation des propriétés diélectriques du milieu de culture qui est une composition biologique hétérogène. Néanmoins, cette expérience démontre que notre système d'acquisition en temps réel est très stable, est ainsi apte à des expériences plus complexes avec des cellules biologiques.

Tableau III. 3 Résumé des contrastes capacitif et conductif à 5 et 40 GHz respectivement, et les écarts-types correspondants, du suivi en temps lorsque le microcanal est rempli d'air (vide), d'eau DI, de milieu RPMI et avec une bille de diamètre de 10 μ m dans du milieu RPMI

	C (fF) à 5 GHz		G (mS) à 40 GHz	
	Val. moy	Std	Val. moy	Std
Vide	3,38	(0,012) 0,36%	0.44	(0,002) 0.12%
Eau DI	32,1	(0,06) 0,2%	2,1	(0,009) 0,43%
Milieu RPMI	31,2	(0,12) 0,39%	2,09	(0,008) 0,4%
Bille dans RPMI	29,2	(0,15) 0,5%	1,89	(0,011) 0,6%

II.2 Suivi en temps réel de cellules THP1

II.2.1 Cellule vivante

Cette expérience consiste à suivre une cellule THP1 pendant 12 min avec intervalle de mesure de 2min. Le procédé d'expérimentation du suivi en temps réel consiste à :

- mesurer le milieu RPMI (la référence – niveau 'zéro' de toutes les mesures),
- injecter la suspension de cellule dans le microcanal jusqu'au piégeage d'une cellule, continuer à injecter du milieu RPMI afin d'avoir une seule cellule dans le canal,
- lancer le programme d'acquisition en temps réel avec un timer défini.

À la fin de la manipulation, la cellule piégée peut être libérée. Puis nous pouvons recommencer un autre suivi en temps réel en répétant les étapes précédentes.

Les contrastes capacitif et conductif de cette expérience sont extraits et présentés à la Figure III. 27. Pour mieux voir le comportement de la cellule, nous avons résumé les valeurs de ΔC et ΔG à 5 GHz et 40 GHz respectivement, elles sont montrées à la Figure III. 28. Pour le ΔC à 5 GHz, nous avons obtenu une valeur moyenne de -0,55 fF avec écart-type de 0,032 fF soit 6%. Tant dis que le ΔG à 40 GHz a une valeur moyenne de -0,038mS avec un écart-type de 0,0056 ms soit 14%.

La cellule biologique vivante est le siège de mécanismes très complexes variant pendant la période de mesure. En outre, le milieu RPMI introduit également une variation non négligeable au cours de mesure, ce qui explique l'écart-type observé.

Néanmoins, les contrastes diélectriques obtenus montrent que la cellule est toujours en vie, sans de signe de faiblesse apparent même après avoir été piégée et mesurée pendant environ 15 min. Ce résultat confirme que notre biocapteur est capable d'effectuer un suivi en temps réel de cellules uniques d'une manière non-invasive et non-destructive.

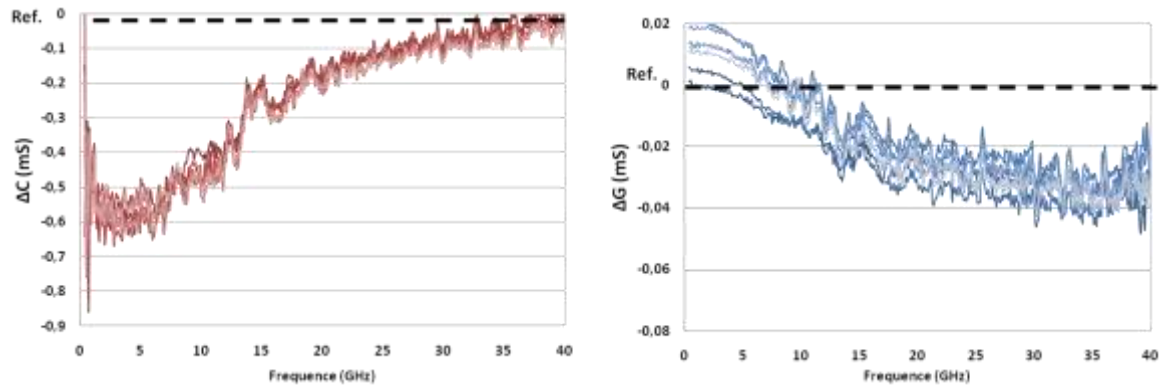


Figure III. 27 Spectres des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droit) d'une cellule THP1 piégée et mesurée pour une période de 12 min, avec une mesure toutes les 2min

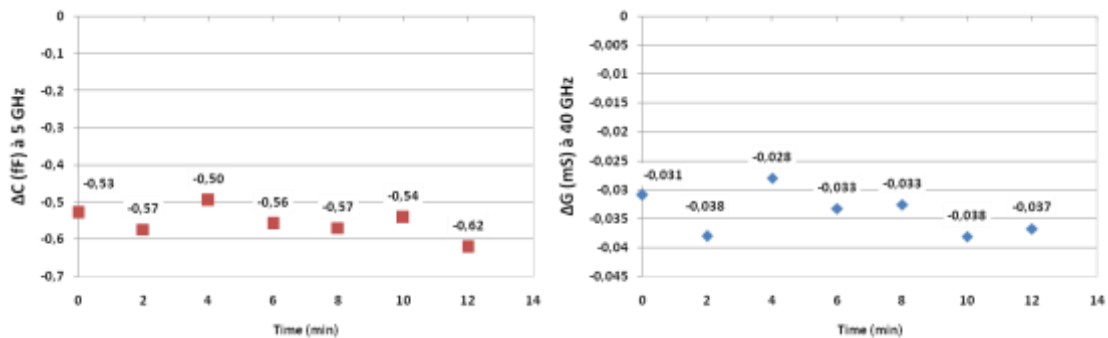


Figure III. 28 Résumé des contrastes ΔC (gauche) et ΔG (droit) à 5 et 40 GHz respectivement d'une cellule unique suivi pendant 12 min, avec une mesure toutes les 2min.

II.2.2 Cellule vivante soumise à un stimulus chimique

Fort du résultat obtenu dans la précédente expérience, nous avons effectué des expériences encore plus complexes : suivi des cellules uniques soumises à un stimulus chimique. Pour cette expérience, nous avons utilisé un détergent : la saponine qui est un tensioactif doux d'origine naturelle de certaines plantes. La saponine affecte la structure intracellulaire et la membrane, elle interagit avec le cholestérol de cette dernière, en l'éliminant de manière sélective et laissant des 'pores' dans la membrane [9]–[11].

Nous avons réalisé une expérience de suivi en temps réel de cellules traitées à la saponine. La viabilité / mortalité des cellules est d'abord évaluée par un test au bleu de Trypan, à différentes concentrations de saponine. Ce résultat est montré à la Figure III. 29. Pour une concentration 0,02% (200 $\mu\text{g/ml}$), la mortalité de cellules est atteinte de 60% et 70% pour une période 10 min et 20min de traitement. Alors que pour une

concentration de 0,01% (100 µg/ml) la mortalité de cellules est de 25% pour la même période de mesure.

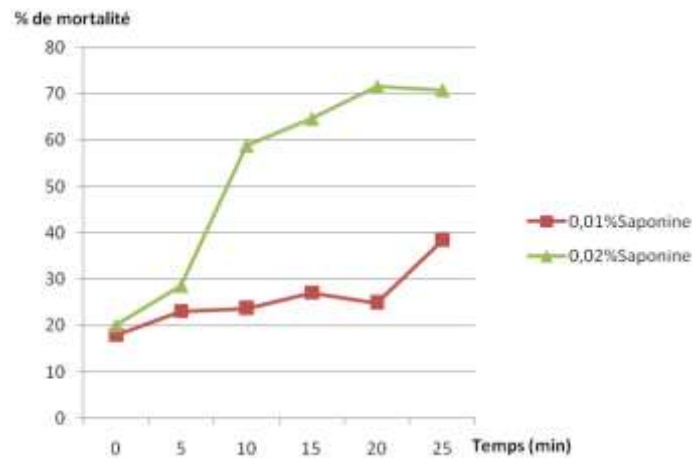


Figure III. 29 Test de viabilité des cellules par méthode de coloration au bleu de Trypan pour deux concentrations de saponine.

Nous utilisons la concentration de saponine à 0,02%, afin de pouvoir mesurer une cellule de l'état vivant à l'état mort. Pour toutes les expériences de suivi en temps réel présentées dans la section suivante, le procédé d'expérimentation est le suivant :

- mesurer le milieu RPMI (la référence – niveau 'zéro' des cellules vivantes),
- mesurer le mélange du milieu RPMI + 0,02% saponine (la référence – niveau 'zéro' des cellules traitées),
- bien rincer le composant avec le milieu RPMI afin d'enlever toutes les traces de saponine,
- injecter la suspension de cellule dans le microcanal jusqu'au piégeage d'une cellule, continuer à injecter du milieu RPMI afin d'avoir une seule cellule dans le canal,
- lancer le programme d'acquisition en temps réel avec un timer défini (suivi des cellules vivantes),
- injecter du milieu RPMI + 0,02% saponine, relancer le programme d'acquisition en changeant le fichier de référence.

II.2.2.a 1^{ère} expérience - Suivi avec une résolution temporelle de l'ordre de la minute

Nous avons d'abord réalisé une expérience avec une cellule piégée et mesurée pendant 8 min avec intervalle de 2min. Au bout de 10min, le mélange du milieu RPMI + 0,02% saponine est introduit dans le microcanal, puis les mesures s'enregistrent toutes les 2min jusqu'à la fin de la manipulation.

Le résultat de cette expérience est montré à la Figure III. 30 et la Figure III. 31. Sur la Figure III. 30, les spectres complets du contraste capacitif sont montrés à gauche, puis à droite, sont résumées les valeurs du ΔC à 5 GHz afin de bien comprendre le comportement de la cellule :

- pendant la première période, la cellule est mesurée dans son état naturel puisque environnée par son milieu de culture RPMI. Nous pouvons observer que le ΔC varie peu. Les données sont en rouge sur la figure,
- pendant la deuxième période, la cellule est soumise au contact avec la saponine. Les données sont en orange sur la figure. Une légère augmentation de la valeur du ΔC : +0,1 fF, apparaît après 2 min après avoir introduit la saponine. Ceci dit, le contraste par rapport le niveau 'zéro' est diminué. Puis une grande augmentation (+0,24 fF) apparaît entre 2min et 4min après avoir introduit la saponine. Ce faible contraste (en valeur absolue) est maintenu jusqu'à la fin de la mesure, puis la cellule s'est éclatée (rupture de la membrane).

De manière similaire, ce phénomène cellulaire est observé sur le comportement du ΔG (Figure III. 31). Une grande augmentation de contraste (+0,21 mS) apparaît entre 2min et 4min après avoir introduit la saponine.

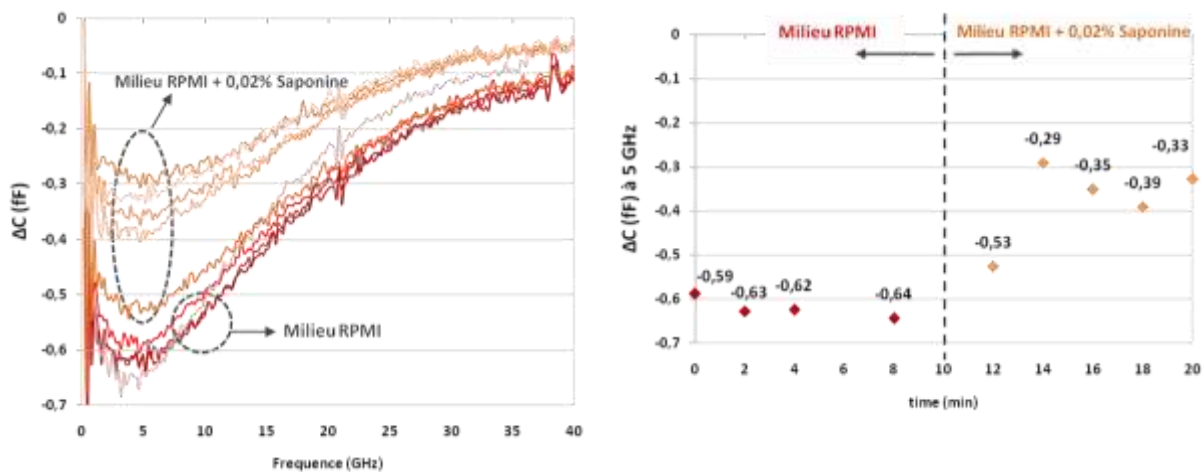


Figure III. 30 Spectres complets du contraste capacitif et ses valeurs à 5 GHz en temps réel sur une durée de 20min

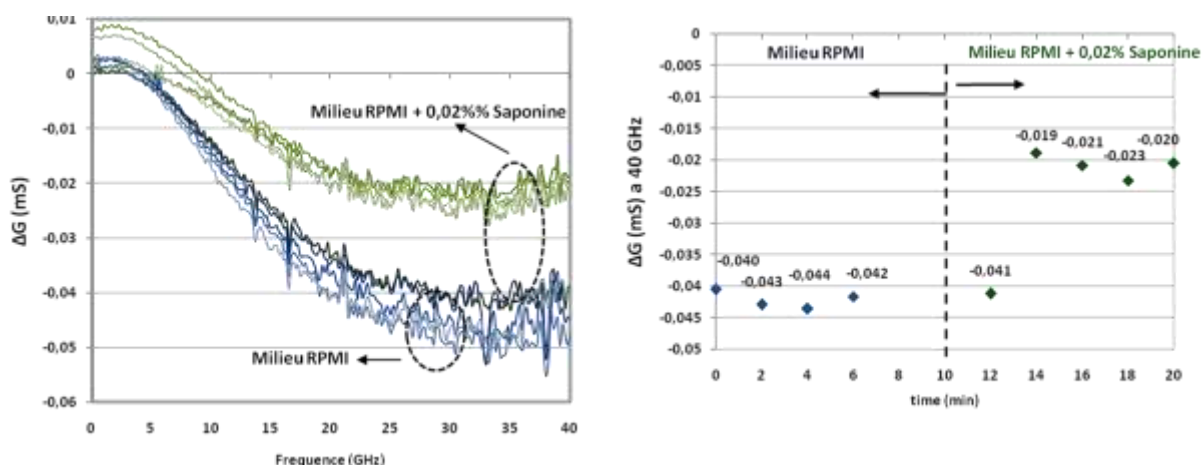


Figure III. 31 Spectres complets du contraste conductif et ses valeurs à 40 GHz en temps réel sur une durée de 20min.

Après avoir effectué plusieurs fois cette expérience, un changement brusque des contrastes capacitif et conductif de la cellule de l'état vivant à l'état mort est toujours

observé. Nous nous sommes donc intéressés à la période de transition avec un suivi de l'ordre de la seconde.

II.2.2.b 2^{ème} expérience - Suivi avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde

Intervalle de mesure : 12s

Pour cette expérience, une cellule vivante est d'abord piégée et suivie pendant 9 min. Ensuite, le mélange RPMI + 0,02% saponine est introduit dans le microcanal. L'enregistrement des données de mesures est lancé environ 1min après l'introduction ce qui comprend le temps de remplissage du microcanal et les manipulations manuelles. L'intervalle de mesure est de 12 secondes. Le résultat de cette expérience est montré à la Figure III. 32 et la Figure III. 33 qui illustrent le ΔC à 5 GHz et le ΔG à 40 GHz respectivement. Un comportement similaire du ΔC et ΔG est observé :

- une diminution des contrastes apparaît d'abord après l'introduction du mélange RPMI + saponine. Ce résultat est supposé dû au fait que la membrane est perméabilisée mais sa structure n'est pas cassée, la cellule est 'gonflée', mais très vite, les contrastes augmentent brutalement par facteur de 3 pendant 12 s (de 10,4 min à 10,6 min). La cellule est supposée morte.

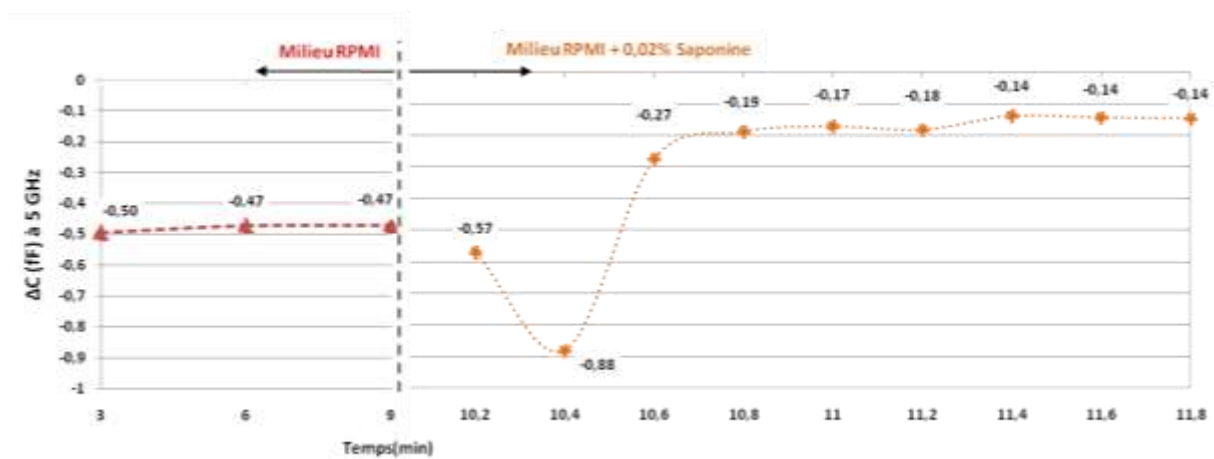


Figure III. 32 Contraste capacitif d'une cellule à 5 GHz suivi en temps réel. La cellule est vivante pendant 9min puis traitée et mesurée par intervalle de 12s

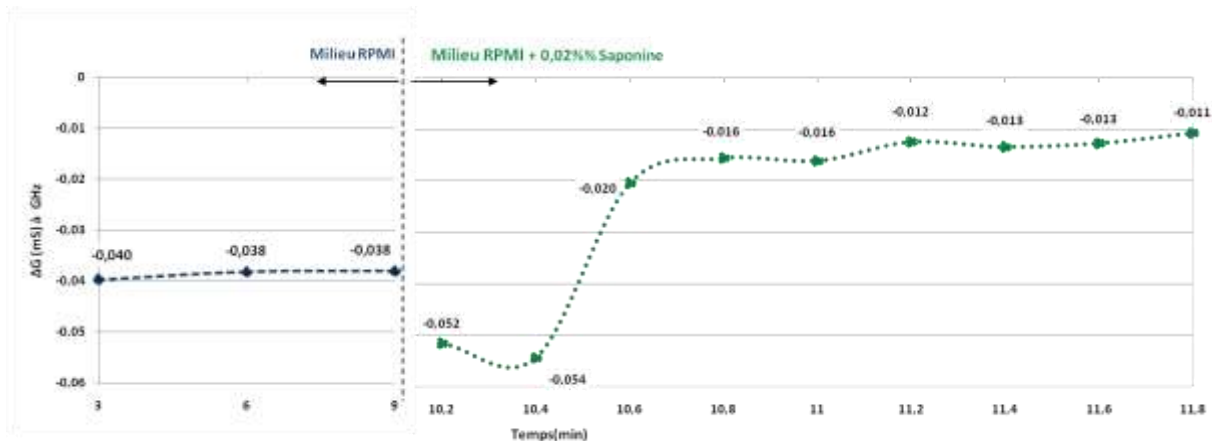


Figure III. 33 Contraste conductif d'une cellule à 40 GHz suivi en temps réel. La cellule est vivante pendant 9min puis traitée et mesurée par intervalle de 12s

Intervalle de mesure : 6s

Pour aller plus loin en résolution temporelle, nous avons décidé de descendre jusqu'à 6 s, qui est la limite d'acquisition actuelle de notre système d'acquisition. L'appareil de mesure VNA Anritsu 37000 a en effet une vitesse de mesure d'environ 20 ms par point pour un balayage de 201 points, ce qui correspond à 4 secondes plus 2 secondes pour ré-initier d'un balayage⁸.

Cette expérience a duré plus de 30 min, la mort ou nécrose de la cellule a été produite 15 min après injection de la saponine. Nous avons continué le suivi en remettant la cellule dans du milieu RPMI. Dans les études en référence [12], l'effet de perméabilisation réversible avec saponine n'est démontré qu'à une faible concentration à l'ordre de 100 µg/ml (de l'ordre de grandeur utilisée pour notre expérience). Nous suggérons que cet effet est observé pendant notre expérience.

La séquence de mesure et le résultat du ΔC à 5 GHz sont présentés sur la Figure III. 34. Sur une échelle de temps jusqu'à 37 min, nous avons effectué plusieurs périodes de mesure avec différents intervalle d'acquisition (Δt) :

- **cellule vivante** : pendant cette période, une cellule vivante est piégée et mesurée pendant 12 min. Le ΔC de la cellule vivante vaut -0,71 fF,
- **cellule traitée avec 0,02% Saponine** : après injection du mélange du milieu RPMI + saponine dans le canal, les mesures sont enregistrées pendant environ 12 min, avec 3 périodes d'analyse – A, B et C.

⁸ Measurement speed of approximately 20 ms per point for an 801 data point sweep means faster tuning and throughput for your millimeter devices.
http://www.testmart.com/webdata/mfr_pdfs/WIL/192_194_37000.pdf

- **A** : 12 mesures se sont effectuées toutes les $\Delta t = 12$ secondes. Le ΔC diminue d'abord d'environ 50% et atteint -1,11 fF, puis varie pendant cette période. Sa valeur finale est de -0,98 fF,
B : 12 mesures se sont effectuées toutes les $\Delta t = 6$ secondes. Une augmentation brusque du ΔC est observée, le contraste varie de -0,9 fF à -0,5 fF,
 - **C** : 12 mesures se sont effectuées toutes les $\Delta t = 30$ secondes. Le ΔC s'établit après la période B, il est aux alentours de -0,5 fF pendant 10min. Cette valeur est supérieure à celle de son état vivant, mais encore inférieure à la valeur d'une cellule morte de -0,2 fF.
- **Cellule resuspendue dans du milieu RPMI** : la cellule est remise dans son milieu de culture RPMI pendant 10 min. Pendant cette période, le ΔC est légèrement diminué et atteint autour de -0,6 fF. Cette valeur est proche à celle de son état vivant. Cette cellule reste en vie mais affaiblie, c'est normal, car la saponine a produit un changement de la structure intracellulaire et de la membrane de la cellule.

Nous pouvons observer le même phénomène sur le comportement du ΔG à 40 GHz (Figure III. 35), la valeur du ΔG de la cellule vivante vaut -0,079 mS. Le contraste est d'abord légèrement diminué pendant la période A, puis augmenté brutalement pendant la période B. Le ΔG s'établit pendant la période C, sa valeur atteint -0,036 mS à la fin de la période de 'Traitement Saponine'. Puis pendant la période 'Sans traitement', le ΔG est diminué et tend vers la valeur de son état vivant.

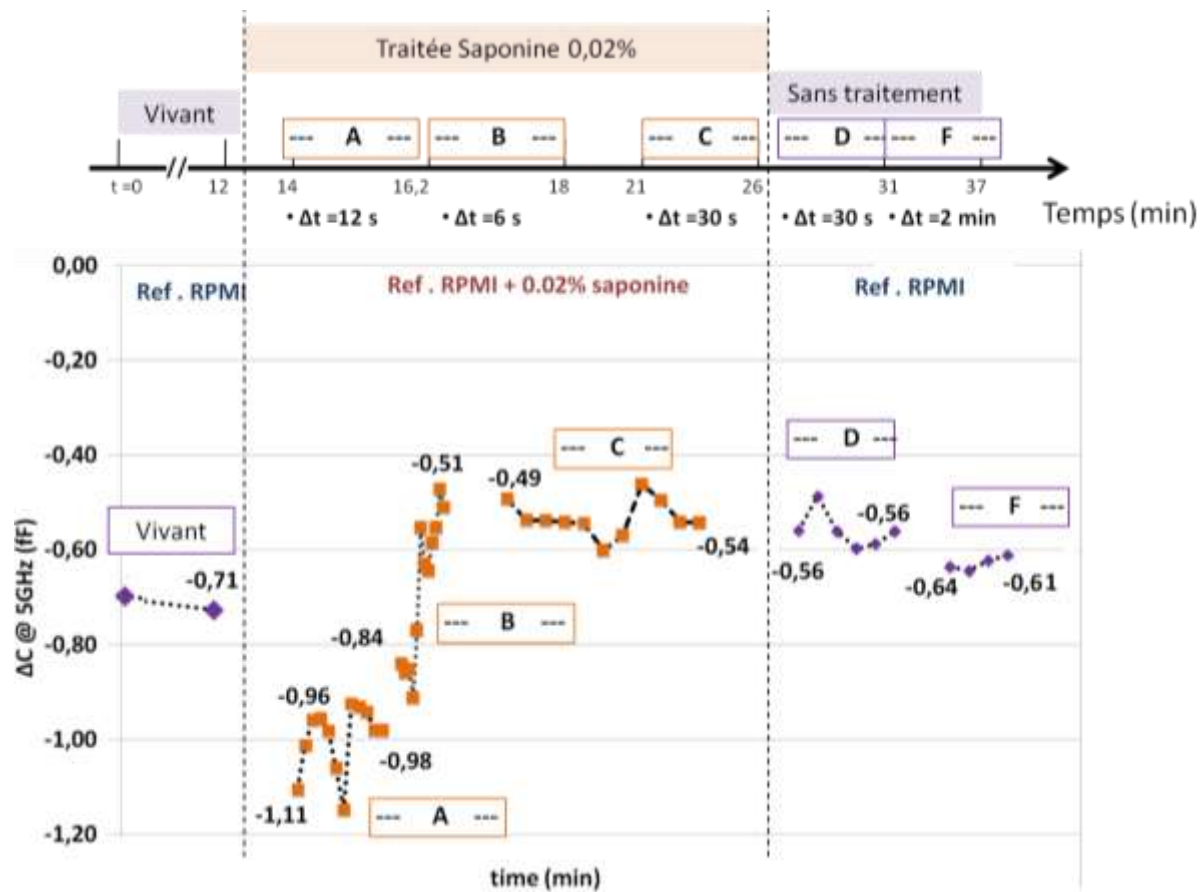


Figure III. 34 Séquence de mesure du suivi d'une cellule avec intervalle descendu à 6s (haut), et le résultat du contraste capacitif à 5 GHz illustré (bas)

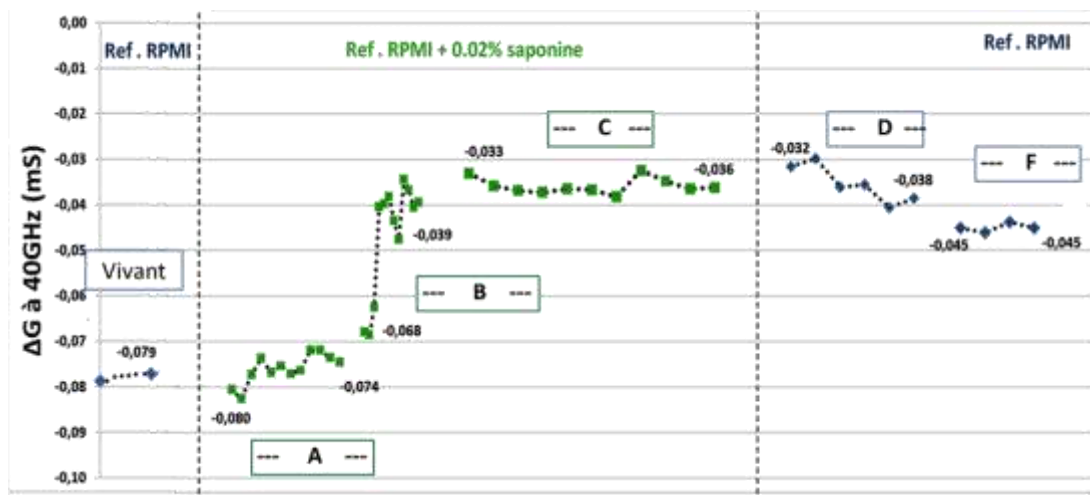


Figure III. 35 Résultat du contraste conductif à 40 GHz illustré du suivi d'une cellule avec intervalle descendu à 6s

III Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, différentes expérimentations ont été effectuées avec pour objectif d'évaluer les performances du biocapteur et de son environnement instrumental pour la caractérisation de cellules biologiques uniques. Tout d'abord, nous avons présenté des expérimentations statiques, réalisées sur des billes et des cellules uniques (avec deux technologies différentes) dans du milieu RPMI. Ces expériences démontrent la très bonne répétabilité et reproductivité de mesures du biocapteur. Des études ont été menées sur des situations biologiques plus complexes : les cellules uniques ont été traitées chimiquement pour induire leur mort. Une seconde partie a présenté les expérimentations dynamiques. Il a ainsi été démontré que le biocapteur est capable de suivre les changements biologiques de cellules uniques avec une résolution de mesure de 6s. L'ensemble des études effectuées démontre que notre biocapteur est capable d'effectuer une analyse cellulaire de manière non-invasive et non-destructive et ne nécessitant aucune préparation préliminaire.

Bibliographie

- [1] S. Tsuchiya, M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, and K. Tada, "Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)," *Int. J. Cancer*, vol. 26, no. 2, pp. 171–176, Aug. 1980.
- [2] M. Purschke, H.-J. Laubach, R. Rox Anderson, and D. Manstein, "Thermal Injury Causes DNA Damage and Lethality in Unheated Surrounding Cells: Active Thermal Bystander Effect," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 130, no. 1, pp. 86–92, Jan. 2010.
- [3] A. Prasad, A. Huefner, S. Mahajan, and A. A. Seshia, "Investigating biomechanical noise in neuroblastoma cells using the quartz crystal microbalance," *J. R. Soc. Interface*, vol. 12, no. 106, p. 20141389, May 2015.
- [4] S. A. Shah, "Comparison of DMSO and glycerol as cryoprotectants for ascites tumor cells," *Experientia*, vol. 39, no. 3, pp. 327–328, Mar. 1983.
- [5] H. G. Hempling and S. White, "Permeability of cultured megakaryocytopoietic cells of the rat to dimethyl sulfoxide," *Cryobiology*, vol. 21, no. 2, pp. 133–143, Apr. 1984.
- [6] Z. W. Yu and P. J. Quinn, "The effect of dimethyl sulphoxide on the structure and phase behaviour of palmitoleoylphosphatidylethanolamine," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1509, no. 1–2, pp. 440–450, Dec. 2000.
- [7] M.-A. deMénorval, L. M. Mir, M. L. Fernández, and R. Reigada, "Effects of Dimethyl Sulfoxide in Cholesterol-Containing Lipid Membranes: A Comparative Study of Experiments In Silico and with Cells," *PLOS ONE*, vol. 7, no. 7, p. e41733, juil 2012.
- [8] A. A. Gurtovenko and J. Anwar, "Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide," *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, no. 35, pp. 10453–10460, Sep. 2007.
- [9] M. A. Lacaille-Dubois and H. Wagner, "A review of the biological and pharmacological activities of saponins," *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.*, vol. 2, no. 4, pp. 363–386, Mar. 1996.
- [10] M. C. Jamur and C. Oliver, "Permeabilization of cell membranes," *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 588, pp. 63–66, 2010.
- [11] M. K. Sung, C. W. Kendall, and A. V. Rao, "Effect of soybean saponins and gypsophila saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture," *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.*, vol. 33, no. 5, pp. 357–366, May 1995.
- [12] K. Medepalli, B. W. Alphenaar, R. S. Keynton, and P. Sethu, "A new technique for reversible permeabilization of live cells for intracellular delivery of quantum dots," *Nanotechnology*, vol. 24, no. 20, p. 205101, May 2013.

Conclusion générale et perspectives

L'analyse des cellules cancéreuses uniques peut tirer profit de la spectroscopie diélectrique dans le domaine d'hyperfréquence. De nos jours, les méthodes conventionnelles sont basées sur les techniques d'imagerie par fluorescence fournissant des observations moléculaires et cellulaires très précises et efficaces, mais bien souvent invasives, chronophages et qui nécessitent des instruments extrêmement coûteux. Face à ces inconvénients, de plus en plus de recherches se lancent dans la pluridisciplinarité: associant la chimie, la physique et l'électronique. Dans le domaine électronique, de nombreuses investigations sur les interactions entre les champs électromagnétiques et des systèmes vivants ont été menées depuis ces deux dernières décades. Bénéficiant des progrès des nano et micro technologies et en associant la microfluidique en parallèle avec l'utilisation des ondes hyperfréquences, une nouvelle manière de sonder la matière biologique est rendue possible jusqu'à l'échelle de la cellule biologique individuelle.

Cette thèse s'est focalisée sur l'optimisation du système d'analyse de cellules cancéreuses uniques par la technique de spectroscopie diélectrique dans le domaine des hyperfréquences. Cette méthode d'analyse non destructive et sans contact conduit aux expérimentations de suivi en temps réel de cellules soumises à des stimuli chimiques.

Dans ce manuscrit, le premier chapitre présente l'état de l'art sur les méthodes d'analyse cellulaire, avec une mise en lumière des méthodes électriques et notamment dans le domaine des micro-ondes.

Le deuxième chapitre traite de l'optimisation du biocapteur dédié à l'analyse par spectroscopie diélectrique micro-onde de cellules individuelles.

- La conception du biocapteur est d'abord introduite. Les matériels et méthodes de mesures ont été décrits. L'extraction des données de mesures a été expliquée. Le banc de mesure a également été optimisé afin de permettre de visualiser le résultat des mesures au cours du temps.
- La microfabrication des dispositifs est détaillée ; une nouvelle technologie à base de Film sec est mise au point. Elle permet de réaliser une fabrication hautement parallèle et à haut rendement, 3 fois plus rapide et moins coûteuse (moitié prix) que la technologie SU-8 employée précédemment.
- L'efficacité de piégeage du système d'immobilisation des cellules uniques est étudiée. Il s'agit d'un piège mécanique, dont le modèle 'Flotteur' a été montré le plus favorable: la cellule est piégée à la position optimale, et peut être libérée après la mesure. Fort de ce résultat, jusqu'à une quarantaine de blocage de

cellules peut être effectuée avec un seul composant, qui est également réutilisable. Ce modèle de piège est employé pour toutes nos expérimentations.

- L'étude paramétrique de la sensibilité de détection du biocapteur est aboutie. Le biocapteur est sensible à la taille de la particule piégée : variation de 10% des contrastes diélectriques pour une variation de un μm de diamètre. Et un gap capacitif du circuit HF de 5 μm est retenu. Le résultat issu des simulations électromagnétiques est également validé avec des mesures de billes de polystyrène.

Dans le troisième chapitre, nous avons enfin présenté les expérimentations avec les cellules biologiques. Les cellules sont mesurées dans leur état naturel, directement dans leur milieu de culture. L'évaluation de la performance de mesure du biocapteur est effectuée.

- Le résultat des expériences statiques obtenu démontre la bonne répétitivité (écart-type de 7% pour le ΔC et ΔG en technologie Film Sec - DF), répétabilité et reproductivité (écart-type de 5%) des mesures. Différents états physiologiques de cellules (vivante, morte par différentes méthodes – thermique ou par agent chimique) ont été discriminés.
- Les expériences en dynamique porte sur un suivi en temps réel de la réaction de cellules uniques soumises à un stress chimique. L'intervalle de mesure a pu être descendu jusqu'à 6 secondes. La cinétique de changement d'état cellulaire de vivant à mort est réalisée.

Ces travaux ouvrent différentes perspectives tant du point de vue technologique avec le développement d'un procédé technologique qui permette d'augmenter l'épaisseur de métallisation du guide d'onde coplanaire afin d'accroître la sensibilité du capteur, tant du point de vue architecture hyperfréquence avec des structures qui permettraient de mesurer simultanément une cellule et son milieu de culture.

Enfin, il est maintenant possible d'aborder par analyse à l'échelle cellulaire par spectroscopie diélectrique micro-onde des processus biologiques complexes et divers en temps réel. Ces travaux ont permis de descendre un intervalle de cinétique de quelques secondes. Ils pourraient être étendus à la mesure de processus biologiques ultra-rapides, inférieurs à la seconde ou au contraire très longs.

Résumé

La mesure de cellules biologiques constitue une étape de routine dans de nombreuses investigations en biologie. Les techniques actuelles utilisées par les biologistes sont principalement basées sur l'utilisation marqueurs optiques de coloration ou fluorescents, qui fournissent des observations moléculaires et cellulaires très précises et efficaces. Dans ce contexte, la spectroscopie diélectrique micro-ondes pour analyse cellulaire constitue une méthode nouvelle et attrayante, en raison du manque de préparation et manipulation des cellules, sans besoin d'ajout de produits chimiques, qui pourraient interférer avec d'autres constituants cellulaires. Sa compatibilité avec l'analyse de cellules uniques, potentiellement en temps réel, constitue également deux atouts importants de la technique d'analyse.

Les travaux de cette thèse ont donc porté sur l'optimisation d'un biocapteur hyperfréquence microfluidique, dédié à la spectroscopie diélectrique de cellules biologiques uniques, et au développement de sa métrologie pour accéder au comportement diélectrique de cellule soumise à des stimuli chimique.

Après un état de l'art sur les techniques courantes d'analyse de cellule individuelle, nous nous sommes attachés à optimiser le biocapteur hyperfréquence pour en améliorer les performances en sensibilité et en répétabilité. Ces optimisations ont porté sur le procédé de micro-fabrication, l'architecture du composant, que ce soit au niveau mécanique vis à vis de l'efficacité de blocage d'une cellule unique, mais aussi d'un point de vue électromagnétique avec une étude paramétrique. Ces études ont été validées dans un premier temps expérimentalement par la mesure de billes de polystyrène, modèle diélectrique simplifié par rapport à la complexité d'une cellule biologique, puis sur cellules individuelles vivantes dans leur milieu de culture. Le banc de caractérisation a également été optimisé afin de permettre la mesure diélectrique de cellules au cours du temps, et notamment en réaction à un stimulus d'ordre chimique. La cinétique de réaction d'une cellule unique soumise à de la saponine a été enregistrée automatiquement pour différentes cellules.

Ces travaux ouvrent ainsi la voie à l'analyse à l'échelle cellulaire par spectroscopie diélectrique micro-onde de processus biologiques complexes en temps réel.

Mots-clés : Cellule biologique unique, Micro-ondes, Biocapteur, Spectroscopie diélectrique, Bio-MEMS, biologie cellulaire

Microwave dielectric spectroscopy of single cancer cells: from sensitivity and repeatability sensor optimization to real time monitoring of chemical stimuli

Abstract

The measurement of biological cells is a routine step in many biological investigations. Current techniques used by biologists are mainly based on staining or fluorescent labelings, which provide very precise and effective molecular and cellular observations. Within this context, the microwave dielectric spectroscopy for cell analysis represents a new and attractive method, due to the lack of cells preparation and manipulation, without adding chemicals that could interfere with other cellular constituents. Its compatibility with the analysis of single-cells, potentially in real-time monitoring, constitute also two major assets of the analysis technique.

This PhD thesis therefore focused on the optimization of a microfluidic and microwave based biosensor, which is dedicated to the dielectric spectroscopy of individual biological cells, and the development of its metrology to assess the dielectric behavior of cells subjected to chemical stimuli.

After a state of the art on the current techniques available to analyze single cells, we focused on the optimization of the microwave biosensor to improve its performances in terms of sensitivity and repeatability. These optimizations dealt with the microfabrication process, the component architecture through the investigation of single cell loading efficacy as well as an electromagnetic parametric study. These developments were validated first experimentally with the measurement of polystyrene beads, which present a simplified dielectric model compared to the complexity of a biological cell, followed then by living individual cells in their culture medium. The test bench was also optimized to allow the dielectric measurement of cells over time, and especially in response to a chemical stimulus. The reaction kinetics of a single-cell subjected to saponin was recorded automatically for different cells.

This work opens the door to single-cell analysis with microwave dielectric spectroscopy of complex biological processes in real-time.

Key words: Single-cell, Microwave, Biosensor, Dielectric spectroscopy, Bio-MEMS, Cell biology

Liste des publications

Revues:

'Microwave Dielectric Spectroscopy of a Single Biological Cell – Part A: Sensor Architecture and Performances, Part B : Biosensor Sensitivity and Repeatability for Cell

Viability Assessment', W. Chen, T. Chen, M. Poupot, J-J. Fournié, D. Dubuc, K. Grenier, invited paper at Biomedical Applications of RF/Micro. Tech. Special Issue of IEEE T-MTT, 2016, submitted.

Conférences Internationales :

'Microwave Dielectric Spectroscopy of a Single Biological Cell with Improved Sensitivity up to 40 GHz', W. Chen, D. Dubuc, K. Grenier, IEEE-IMS2015, Phoenix, USA, 17-22 Mai 2015.

'Parametric study of a microwave sensor dedicated to the dielectric spectroscopy of single particles and biological cells', W. Chen, D. Dubuc, K. Grenier, European Microwave Conference (IEEE-EuMC 2015), Paris, France, 6-11, September 2015.

'Impact of sensor metal thickness on microwave spectroscopy sensitivity for individual particles and biological cells analysis', W. Chen, D. Dubuc, K. Grenier, IEEE Biowireless, Austin, USA, 24-27 Janvie, 2016.

Conférences Nationales :

'Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de la cellule biologique unique avec sensibilité maximisée jusqu'à 40GHz', W. Chen, D. Dubuc, K. Grenier, Journées Nationales Microondes (JNM2015), Bordeaux, France, 2-5 Juin 2015.

'Optimisation d'un micro-capteur dédié à la spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellule biologique individuelle', W. Chen, D. Dubuc, K. Grenier, Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique (JNRDM 2016), Toulouse, France, 11-13 Mai 2016.

Annexe I. A Review of ABCD Parameters

A Review of ABCD Parameters

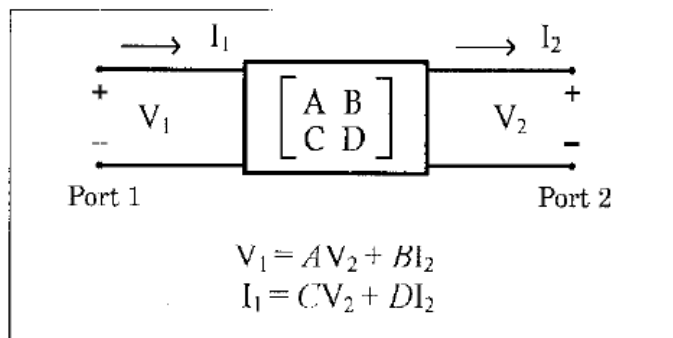
By David Thorson
Phonex Corporation

This article reviews transmission matrices (ABCD parameters), their definition, and their application in microwave circuit analysis. It presents their relationship to scattering parameters and demonstrates their use by analyzing a popular transistor amplifier circuit.

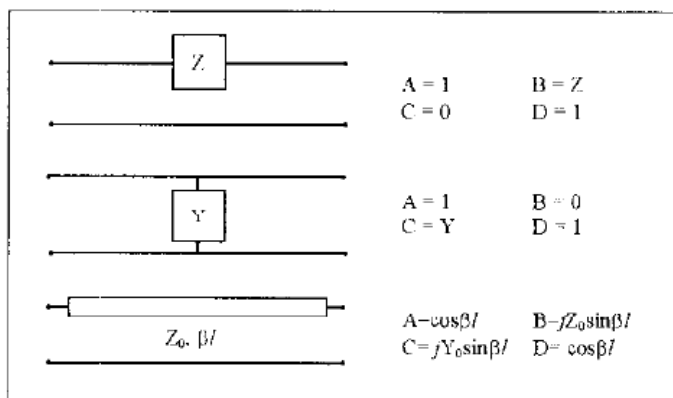
Several parameter sets exist for characterizing linear two-port networks. The most common parameter sets include admittance (y), impedance (z), hybrid (h), and scattering (s) parameters. Although these sets can be used to describe a linear network with an arbitrary number of ports, this article will only discuss two-port networks. The terminal characteristics of a given two-port are represented by any of these parameter sets as a 2×2 matrix with each element generally being a complex number. These parameter representations can be used to describe both active and passive networks. It is important to note that these sets are valid only for linear networks. When these sets are used to model active devices the network must be operating under small signal conditions. Other parameter sets exist for describing large signal operation but they will not be discussed here.

It is helpful to understand that a given two-port can be represented by any of these parameter sets and that the terminal behavior of the network is completely described by that set. No new information is given in one set that is not available in another set's representation of the network. Formulas exist in many texts for conversion between the various parameter sets [1]. The differences lie in how the two-port sets are measured and how they are used. Certain circuit configurations are more easily characterized by one set than another. Parameter sets y , z , and h represent ratios of voltages and currents at the terminals of the two-port and are measured with open or short circuit port terminations. Hybrid parameters have commonly been used to describe transistor behavior at DC and low frequencies. Admittance parameters have been used extensively for transistor characterization at higher frequencies and many design methods exist for transistors based on this parameter set [2]. Series and parallel connections of two two-port networks are easily analyzed by the use of impedance and admittance parameters respectively.

Scattering parameters, mainly used to characterize networks at microwave frequencies, represent ratios of



▲ Figure 1. Two-port ABCD parameter definitions.



▲ Figure 2. Some common two-port networks and their ABCD parameters.

incident and reflected traveling waves (voltage or current). They are measured by terminating the network in a known real impedance (usually 50 ohms) rather than an open or short circuit. This is due to the difficulty in producing open and short circuits at high frequencies and because active devices can become unstable with highly reflective loads. Scattering parameters are also popular because powerful design and analysis methods have been developed using this parameter set.

Transmission or ABCD parameters are another 2×2 matrix parameter set that can be used to characterize linear two-port networks. The defining equations for an ABCD matrix in relation to a two-port are given in Figure 1. The individual parameters represent ratios of

DESIGN IDEAS

the voltage or current at port 1 with the voltage or current at port 2. For example, $A = V_1/V_2$ with $I_2 = 0$ (open circuit at port 2), $B = V_1/I_2$ with $V_2 = 0$ (short circuit at port 2), and so on. It is evident that ABCD parameters are quite similar to hybrid parameters. The unique advantage of ABCD parameters is that a cascaded network of two or more two-ports can be easily analyzed by multiplying the individual transmission matrices. This can be very useful in microwave network analysis since many circuits consist of cascaded connections of both active and passive elements. Some common two-port networks along with their ABCD representations are shown in Figure 2. The following example will demonstrate the use of transmission matrices in circuit analysis.

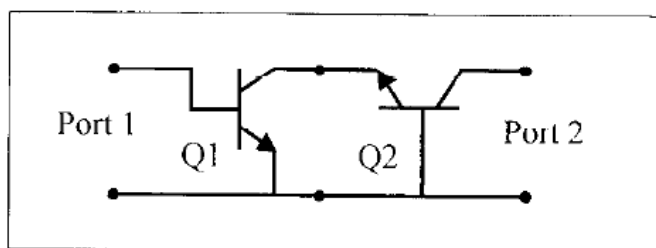
A useful transistor amplifier circuit is the cascode buffer configuration. It consists of a common emitter transistor followed by a common base transistor as shown in Figure 3. This circuit has many advantages over a single transistor amplifier. The cascode configuration offers improved frequency response due to a reduction of the Miller effect. It has a much lower reverse transmission which provides higher isolation from output to input and generally provides higher gain. This circuit may find application between an antenna and a mixer in a receiver. The increased reverse isolation will reduce the amount of emissions at the antenna due to the local oscillator frequency. This circuit may also serve as a buffer following an oscillator to decrease the amount of load pulling although the small signal condition may not apply. A disadvantage of this circuit is the additional power supply voltage needed since V_{ceQ2} must be biased above V_{ceQ1} .

The transmission parameters for both Q1 and Q2 are needed in their respective configurations to analyze the circuit as a single two-port. This example uses the NE85633 operating at $I_c = 3$ mA, $V_{ce} = 2.5$ V and 900 MHz. Note that the two transistors do not need to have the same bias voltage but they must have the same collector current. The scattering parameters for this device in common emitter configuration at the above conditions (as provided by the manufacturer) are

$$\begin{aligned} s_{11} &= .495\angle-158^\circ & s_{12} &= .132\angle45^\circ \\ s_{21} &= 2.55\angle75^\circ & s_{22} &= .415\angle-52^\circ \\ K &= .922 & |\Delta| &= .188 \end{aligned}$$

Again, the information contained in these parameters is sufficient to determine the ABCD representation of this network, eliminating any need to measure them directly (which may be difficult if not impossible). The appendix includes the relationships for converting between scattering and ABCD parameters. The ABCD parameters for Q1 can be derived directly from these relations while those for Q2 must be found by first converting the above data to common base configuration.

This is straightforward using the relations in [2]



▲ Figure 3. Circuit example used for illustration: a cascode transistor buffer amplifier.

which further demonstrate that using any one parameter set in a given configuration completely describes the network for use in any other configuration. The transmission matrix for Q2 can then be found and is given in polar form along with that for Q1 as

$$\begin{aligned} A_{Q1} &= .086\angle-26^\circ & A_{Q2} &= .094\angle151^\circ \\ B_{Q1} &= 10.3\angle-116^\circ & B_{Q2} &= 11.2\angle61^\circ \\ C_{Q1} &= .005\angle-63^\circ & C_{Q2} &= .005\angle112^\circ \\ D_{Q1} &= .339\angle-73^\circ & D_{Q2} &= 1.01\angle18^\circ \end{aligned}$$

Using matrix multiplication the equivalent two-port transmission matrix is found as

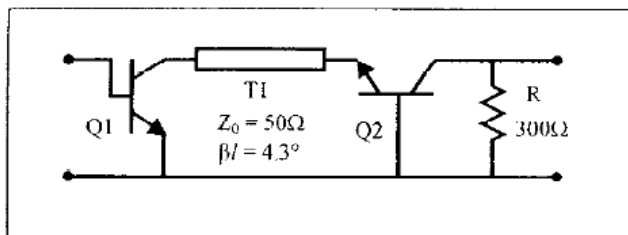
$$\begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{Q1} & B_{Q1} \\ C_{Q1} & D_{Q1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{Q2} & B_{Q2} \\ C_{Q2} & D_{Q2} \end{bmatrix}$$

Note that the order of the matrices on the right hand side is important since matrix multiplication is not commutative. The order of the matrices must appear in the same order as the circuit elements. The result, after converting back to scattering parameters, is found as

$$\begin{aligned} s_{11} &= .536\angle\pm134^\circ & s_{12} &= .008\angle172^\circ \\ s_{21} &= 3.85\angle47^\circ & s_{22} &= 1.12\angle-30^\circ \\ K &= -3.59 & |\Delta| &= .572 \end{aligned}$$

Note that the magnitude of the reverse transmission coefficient, s_{12} , has been significantly reduced compared to that of a single transistor. However, the network now suffers from greater instability as indicated by the factor K and the magnitude of s_{22} . In fact, a stability analysis shows that no passive source termination will make the reflection coefficient looking into the output less than one. This will restrict the value of the load termination needed for stability and may limit the application of this circuit as an amplifier. To demonstrate ABCD parameters further, the stability of this circuit will be improved by adding a shunt resistance at the output of the network. This resistive loading technique can sometimes be used to improve stability [3]. The resistance is in cascade with the network which makes ABCD parameters a useful method to analyze the loading effect as shown in

DESIGN IDEAS



▲ Figure 4. Resistive loading for improved stability.

Figure 4. Also, a short transmission line is included between the two transistors for demonstration and for practicality in circuit realization. The values for the two added elements are also shown in the figure and their ABCD representations can be found from the relations in Figure 2. The resulting equation for the network is

$$\begin{bmatrix} A & B \\ C & D \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{Q1} & B_{Q1} \\ C_{Q1} & D_{Q1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{T1} & B_{T1} \\ C_{T1} & D_{T1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_{Q2} & B_{Q2} \\ C_{Q2} & D_{Q2} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} A_R & B_R \\ C_R & D_R \end{bmatrix}$$

where the order of the matrices is once again emphasized. The resulting scattering parameters are

$$\begin{aligned} s_{11} &= .553 \angle -134^\circ & s_{12} &= .007 \angle 172^\circ \\ s_{21} &= 3.38 \angle 47^\circ & s_{22} &= .820 \angle -30^\circ \\ K &= 4.57 & |\Delta| &= .434 \end{aligned}$$

The two-port maintains the high reverse isolation, the forward transmission is still high, but now the network is unconditionally stable. The transmission line is negligible but the 300 ohm resistor has greatly improved the usefulness of this circuit. The designer is now free to use whatever source and load terminations necessary to meet gain, VSWR, and noise requirements. For example, if maximum gain is needed the network may be designed with a simultaneous conjugate match. The transducer power gain for this network with this

match is greater than 17 dB. Other terminations can be used to satisfy other requirements.

This analysis using ABCD parameters has proven quite simple and straightforward. The same analysis could have been performed with methods based on the original scattering parameters. For example, Mason's rule is a powerful approach that is well suited for cascaded as well as other connections of two-ports. However, this method becomes very cumbersome for networks containing more than a few elements. Transmission parameters are clearly easier to use for these types of networks.

This article has demonstrated the advantage of using ABCD parameters in analyzing cascaded connections of two-port networks. The simplified example above requires additional work to be done to account for stability at other frequencies and to account for noise, mismatch, and other performance criteria. Much of this additional work could also be done using transmission parameters. In fact, by combining ABCD parameters along with the other parameter sets, almost all types of linear networks can easily be analyzed. All these parameter representations serve as powerful tools in linear circuit analysis. ■

References

1. David M. Pozar, *Microwave Engineering*, Addison-Wesley, 1990.
2. H. Krauss, C. Bostian and F. Raab, *Solid State Radio Engineering*, John Wiley & Sons, 1980.
3. G. Gonzalez, *Microwave Transistor Amplifiers*, Prentice-Hall, 1984.

Author information

Dave Thorson received his BSEE and MSEE from the University of Utah in 1995 and 1997. He currently works for Phonex Corporation designing wireless consumer electronic products. He can be reached at dthorson@phonex.com

$$\begin{aligned} A &= \frac{(1 + s_{11})(1 - s_{22}) + s_{12}s_{21}}{2s_{21}} & s_{11} &= \frac{A + \frac{B}{Z_0} - CZ_0 - D}{\Delta T} \\ B &= Z_0 \frac{(1 + s_{11})(1 + s_{22}) - s_{12}s_{21}}{2s_{21}} & s_{12} &= \frac{2(AD - BC)}{\Delta T} \\ C &= \frac{1}{Z_0} \frac{(1 - s_{11})(1 - s_{22}) - s_{12}s_{21}}{2s_{21}} & s_{21} &= \frac{2}{\Delta T} \\ D &= \frac{(1 - s_{11})(1 + s_{22}) + s_{12}s_{21}}{2s_{21}} & s_{22} &= \frac{-A + \frac{B}{Z_0} - CZ_0 + D}{\Delta T} \end{aligned}$$

where: $\Delta T = A + \frac{B}{Z_0} + CZ_0 + D$

▲ Appendix. s to ABCD parameter (left) and ABCD to s parameter (right) conversions.

Annexe II. Two-Port Network Parameters

Appendix E

Two-Port Network Parameters

A microwave network with two terminals may be analyzed by considering the network as an equivalent two-port. The signals at the terminals or ports of the two-port may be described in terms of voltages and currents and the interaction between these signals in terms of impedances or admittances. Alternatively, the signals may be described in terms of incident and reflected waves and the interaction in terms of scattering.

An arbitrary two-port may be described in several ways. Here we will discuss the two-port in terms of impedance parameters (Z), admittance parameters (Y), chain or ABCD parameters and scattering parameters (S).

For the description in terms of Z, Y or ABCD parameters we refer to Figure E.1(a). For the description in terms of S parameters we refer to Figure E.1(b).

The relation between the voltages and currents in terms of impedance parameters is given by

$$\begin{pmatrix} V_1 \\ V_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} Z_{11} & Z_{12} \\ Z_{21} & Z_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \end{pmatrix}. \quad (\text{E.1})$$

The relation between the currents and voltages in terms of admittance parameters is given by

$$\begin{pmatrix} I_1 \\ I_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} Y_{11} & Y_{12} \\ Y_{21} & Y_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} V_1 \\ V_2 \end{pmatrix}. \quad (\text{E.2})$$

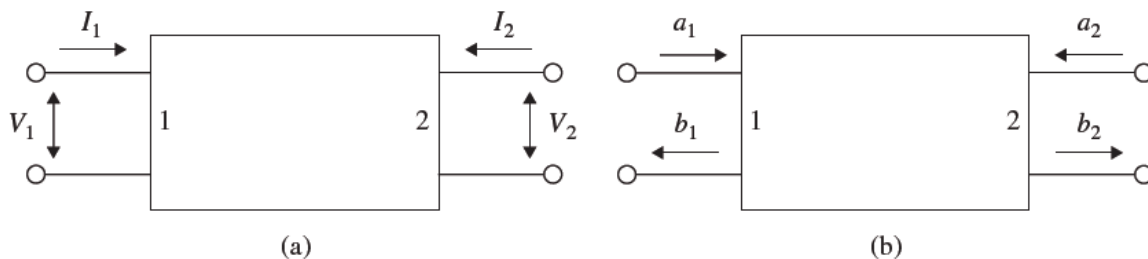


Figure E.1 Two-port definition. (a) Using voltages and currents. (b) Using incident and reflected waves.

Table E.1 Two-port parameter conversion for voltage- and current-based matrices

	Z		Y		ABCD	
Z	Z_{11}	Z_{12}	$\frac{Y_{22}}{ Y }$	$-\frac{Y_{12}}{ Y }$	$\frac{A}{C}$	$\frac{AD-BC}{C}$
	Z_{21}	Z_{22}	$-\frac{Y_{21}}{ Y }$	$\frac{Y_{11}}{ Y }$	$\frac{1}{C}$	$\frac{D}{C}$
Y	$\frac{Z_{22}}{ Z }$	$-\frac{Z_{12}}{ Z }$	Y_{11}	Y_{12}	$\frac{D}{B}$	$\frac{BC-AD}{B}$
	$-\frac{Z_{21}}{ Z }$	$\frac{Z_{11}}{ Z }$	Y_{21}	Y_{22}	$-\frac{1}{B}$	$\frac{A}{B}$
ABCD	$\frac{Z_{11}}{Z_{21}}$	$\frac{ Z }{Z_{21}}$	$-\frac{Y_{22}}{Y_{21}}$	$-\frac{1}{Y_{21}}$	A	B
	$\frac{1}{Z_{21}}$	$\frac{Z_{22}}{Z_{21}}$	$-\frac{ Y }{Y_{21}}$	$-\frac{Y_{11}}{Y_{21}}$	C	D

Table E.2 Two-port parameter conversion for scattering and voltage- and current-based matrices

	S		Z	
S	S_{11}	S_{12}	$\frac{(Z_{11}-Z_0)(Z_{22}+Z_0)-Z_{12}Z_{21}}{\Delta Z}$	$\frac{2Z_{12}Z_0}{\Delta Z}$
	S_{21}	S_{22}	$\frac{2Z_{21}Z_0}{\Delta Z}$	$\frac{(Z_{11}+Z_0)(Z_{22}-Z_0)-Z_{12}Z_{21}}{\Delta Z}$
	S		Y	
S	S_{11}	S_{12}	$\frac{(Y_0-Y_{11})(Y_0+Y_{22})+Y_{12}Y_{21}}{\Delta Y}$	$-\frac{2Y_{12}Y_0}{\Delta Y}$
	S_{21}	S_{22}	$-\frac{2Y_{21}Y_0}{\Delta Y}$	$\frac{(Y_0+Y_{11})(Y_0-Y_{22})+Y_{12}Y_{21}}{\Delta Y}$
	S		ABCD	
S	S_{11}	S_{12}	$\frac{A+\frac{B}{Z_0}-CZ_0-D}{A+\frac{B}{Z_0}+CZ_0+D}$	$\frac{2(AD-BC)}{A+\frac{B}{Z_0}+CZ_0+D}$
	S_{21}	S_{22}	$\frac{2}{A+\frac{B}{Z_0}+CZ_0+D}$	$\frac{-A+\frac{B}{Z_0}-CZ_0+D}{A+\frac{B}{Z_0}+CZ_0+D}$

The relation between the voltages and currents in terms of chain parameters is given by

$$\begin{pmatrix} V_1 \\ I_1 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} V_2 \\ -I_2 \end{pmatrix}. \quad (\text{E.3})$$

Chain matrices are used when several two-ports are cascaded. The overall chain matrix is obtained by multiplying the chain matrices of the individual two-ports.

Table E.3 Two-port parameter conversion for scattering and voltage- and current-based matrices

	S	
S	S_{11} S_{12} S_{21} S_{22}	
Z	$Z_0 \frac{(1+S_{11})(1-S_{22})+S_{12}S_{21}}{(1-S_{11})(1-S_{22})-S_{12}S_{21}}$ $Z_0 \frac{2S_{21}}{(1-S_{11})(1-S_{22})-S_{12}S_{21}}$	$Z_0 \frac{2S_{12}}{(1-S_{11})(1-S_{22})-S_{12}S_{21}}$ $Z_0 \frac{(1-S_{11})(1+S_{22})+S_{12}S_{21}}{(1-S_{11})(1-S_{22})-S_{12}S_{21}}$
Y	$Y_0 \frac{(1-S_{11})(1+S_{22})+S_{12}S_{21}}{(1+S_{11})(1+S_{22})-S_{12}S_{21}}$ $-Y_0 \frac{2S_{21}}{(1+S_{11})(1+S_{22})-S_{12}S_{21}}$	$-Y_0 \frac{2S_{12}}{(1+S_{11})(1+S_{22})-S_{12}S_{21}}$ $Y_0 \frac{(1+S_{11})(1-S_{22})+S_{12}S_{21}}{(1+S_{11})(1+S_{22})-S_{12}S_{21}}$
ABCD	$\frac{(1+S_{11})(1-S_{22})+S_{12}S_{21}}{2S_{21}}$ $\frac{1}{Z_0} \frac{(1-S_{11})(1-S_{22})-S_{12}S_{21}}{2S_{21}}$	$Z_0 \frac{(1+S_{11})(1+S_{22})-S_{12}S_{21}}{2S_{21}}$ $\frac{(1-S_{11})(1+S_{22})+S_{12}S_{21}}{2S_{21}}$

The relation between the incident and reflected waves is given by

$$\begin{pmatrix} b_1 \\ b_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} a_1 \\ a_2 \end{pmatrix}. \quad (\text{E.4})$$

The Z, Y, ABCD and S matrices may be converted into each other. The interrelations between the voltage- and current-based matrices are given in Table E.1.

The interrelations between the scattering and voltage- and current-based matrices are given in Tables E.2 and E.3.